

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Producción Animal



TESIS DOCTORAL

**Mecanismos genéticos de adaptación de microalgas al cambio
ambiental brusco: extinciones masivas y antropoceno**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raquel González González

Directores
Victoria López Rodas
Eduardo Costas Costas

Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Producción Animal

**MECANISMOS GENÉTICOS DE
ADAPTACIÓN DE MICROALGAS AL
CAMBIO AMBIENTAL BRUSCO:
EXTINCIONES MASIVAS Y
ANTROPOCENO**

TESIS DOCTORAL

RAQUEL GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Madrid, Abril de 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Producción Animal

**MECANISMOS GÉNETICOS DE
ADAPTACIÓN DE MICROALGAS AL
CAMBIO AMBIENTAL BRUSCO:
EXTINCIONES MASIVAS Y
ANTROPOCENO**

**Memoria para optar al título de
Doctor en Veterinaria.**

Presenta: Raquel González González

**DIRECTORES: Dra. Victoria López Rodas
Dr. Eduardo Costas Costas**

Madrid, Abril de 2014



La Dra. Victoria López Rodas y el Dr. Eduardo Costas Costas, ambos Catedráticos de Genética del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

HACEN CONSTAR:

- 1) Que la Tesis presentada por Raquel González González titulada: “Mecanismos genéticos de adaptación de microalgas al cambio ambiental brusco: Extinciones masivas y antropoceno”, ha sido realizada en el Departamento de Producción Animal (Genética) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo su Dirección.
- 2) Que autorizan su presentación para que la doctoranda pueda obtener el título de Doctor.

Y para que así conste, lo firmamos en Madrid a diecinueve de Marzo de dos mil catorce.

Dra. Victoria López Rodas
Catedrática de Genética
Dpto. de Producción Animal
Facultad de Veterinaria. UCM

Dr. Eduardo Costas Costas
Catedrático de Genética
Dpto. de Producción Animal
Facultad de Veterinaria. UCM

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una u otra forma, han contribuido a que haya podido llevar a cabo la realización de esta tesis, pero de forma muy especial:

A Victoria y Eduardo, por acogerme en su grupo de investigación, darme la oportunidad de poder conseguir este objetivo y por mostrarme como es el mundo de la ciencia, ellos me han enseñado que descansa en seis pilares básicos: superación, esfuerzo, objetividad, disciplina, rigurosidad y constancia.

A todo el grupo de investigación Albio-Tox: Macarena, Camino, Bea, Alex, Enrique, ... por todo el apoyo prestado durante todos estos años.

A Lara, técnico de Laboratorio de grupo, por su colaboración en la realización de los experimentos y por todos los buenos ratos que hemos pasado juntas.

A los magníficos profesionales (Emma Huertas, Antonio Flores, Sebastián Sánchez Fortún y Mónica Rouco) que, también, de alguna manera han colaborado en la consecución de esta tesis con sus consejos y experiencias.

A toda mi familia, porque siempre han estado ahí apoyándome, aconsejándome y ayudándome en los momentos difíciles, por enseñarme a luchar por lo que quiero y a terminar lo empezado. Especialmente a mi madre, ya que no habría llegado hasta donde estoy sin su ayuda, por su motivación, por su paciencia y por sus enseñanzas. Ella ha sido mi referencia y mi guía durante todos estos años. Tampoco quiero olvidarme de mi padre, por haber creído siempre en mí; de mi hermana, por animarme como nadie, por su alegría, sensatez y energía, y de mis abuelos, que siempre han sido un ejemplo de desinterés y generosidad.

A Sergio, por estar a mi lado, por su cariño, por sus sabios consejos y por su comprensión. Él ha sido imprescindible en la elaboración de gráficas y tablas. Sergio, gracias por acompañarme en esta dura etapa y por hacerme mirar con ilusión hacia adelante con los proyectos futuros.

A mis amigas: Pat, María, Raquel, Celia, Raquel, Sheyla, Ame, pero especialmente a Cris, personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron dispuestas para brindarme toda su ayuda.

Por último, quisiera expresar mi agradecimiento al Ministerio de Educación Cultura y Deporte al concederme una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU), lo que ha supuesto el soporte económico personal indispensable para la realización del presente trabajo; pero, también, agradecer la subvención económica aportada por los proyectos: CGL 2008 - 00652, CTM 2008 - 05680 - C02 -02 y CTM 2012 - 34757, que ha permitido la financiación de la investigación realizada.

A mi familia

*" Si tienes un gran un sueño debes
estar dispuesto a un gran esfuerzo
para concretarlo, porque solo
lo grande alcanza a lo grande"*

Facundo Cabral

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	9
3. INTRODUCCIÓN.....	17
3.1. Historia del clima en la tierra.....	19
3.2. Antropoceno.....	23
3.2.1. Eutrofización.....	27
3.2.2. Acidificación de los océanos.....	29
3.2.3. Calentamiento global.....	31
3.2.4. Contaminantes de origen antropogénico.....	34
3.3. Problemas derivados del cambio global.....	35
3.3.1. Especies invasoras.....	36
3.3.2. Floraciones masivas de microalgas tóxicas (HABs).....	37
3.4. Importancia ecológica del fitoplancton.....	38
3.4.1. Los ecosistemas acuáticos.....	39
3.4.2. Diferentes grupos ecológicos del fitoplancton.....	43
3.5. Estrategias adaptativas y origen de la adaptación en el fitoplancton.....	44
3.5.1. Fuerzas implicadas en la evolución.....	46
3.5.2. Adaptación de los microorganismos fitoplanctónicos.....	48
3.5.3. Límites de la adaptación de los microorganismos fitoplanctónicos.....	50
4. OBJETIVOS.....	53

5. MATERIAL Y MÉTODOS..... 57

5.1. Microalgas empleadas en los experimentos.....59

5.1.1. Fitoplancton de agua dulce..... 59

5.1.2. Fitoplancton de agua marina..... 60

5.2. Medios y condiciones de cultivo.....62

5.2.1. Medios de cultivo.....62

5.2.2. Condiciones de cultivo.....66

5.3. Procedimientos experimentales67

5.3.1. Contaminantes.....67

5.3.2. Cálculo de la dosis-efecto de los cinco contaminantes
utilizados.....67

5.3.3. Determinación de las fuerzas evolutivas implicadas en la
adaptación y estudio de la naturaleza de la adaptación:
Experimento de ancestrales y derivadas.....70

5.3.4. Determinación del origen de la adaptación y aparición de las
mutaciones: Experimento del análisis de fluctuación y test de
Newcombe.....77

5.3.5. Determinación del límite de la adaptación: Experimento de
ratchet.....86

5.3.6. Determinación y estudio de especies invasoras transportadas
mediante el *biofouling* de los barcos93

5.3.7. Experimento de biorremediación empleando los mutantes
resistentes obtenidos en el análisis de fluctuación frente al
hexaclorociclohexano (lindano)94

6. RESULTADOS..... 97

CAPÍTULO I: Determinación de las fuerzas evolutivas implicadas en la adaptación al cambio global99

- *Effects of adaptation, chance and history on the evolution of the toxic
dinoflagellate Alexandrium minutum under selection of increased
temperature and acicification*101

CAPÍTULO II: Adaptación del fitoplancton a la contaminación de origen antropogénico.....	113
- <i>Adaptation of microalgae to lindane: A new approach for bioremediation</i>	<i>117</i>
- <i>The ignored stowaways: worldwide dispersion of exotic microalgae species through the biofouling recovering the ships underwater body</i>	<i>127</i>
- <i>Mutation of microalgae from antifouling sensitivity to antifouling resistance allows phytoplankton dispersion through ships biofouling.....</i>	<i>149</i>
- Investigación complementaria: Adaptación de la microalga <i>D. chlorelloides</i> a la contaminación por metales pesados: plomo e iridio.....	163
CAPÍTULO III: ¿Cuáles son los límites de la adaptación?.....	169
- <i>Adaptation of cyanobacteria to anthropogenic and natural stress: the role played for spontaneous mutation</i>	<i>173</i>
- Investigación complementaria: Determinación de la máxima capacidad de adaptación de cianobacterias y clorofitas frente a dosis crecientes de sulfato de cobre	189
Adaptación de <i>Symbiodinium</i> Cepa C1 al calentamiento global mediante el análisis de fluctuación y <i>ratchet</i> modificado	197
7. DISCUSIÓN.....	207
8. CONCLUSIONES.....	227
9. BIBLIOGRAFÍA	231



1. RESUMEN

1. RESUMEN

1.1 Introducción

A lo largo de la historia de la Tierra nuestro planeta ha estado marcado por varios periodos de crisis ambiental. Las grandes depresiones bióticas globales del pasado geológico fueron provocadas por causas físicas y desastres naturales, dichos eventos son conocidos como las cinco grandes extinciones en masa. Sin embargo, hoy en día la Tierra está perdiendo alrededor de 30.000 especies por año y la tasa de extinción actual es 30 veces mayor que en las últimas décadas (Woodruff, 2001). Esta grave situación está empezando a preocupar a la comunidad científica, que ha calificado a esta nueva era como la sexta extinción. Los episodios de extinción provocados por factores físicos del pasado aparentemente no tienen ninguna relación con la presente sexta extinción, que está siendo causada principalmente como resultado de las actividades humanas. Uno de los impactos más preocupantes es el aumento del CO₂ atmosférico, el cual ha ido creciendo gradualmente desde los niveles preindustriales, ligeramente superiores a 250 ppm, hasta alcanzar en la actualidad un valor cercano a 380 ppm, situación casi límite ya que si se quiere que la temperatura de la superficie de los océanos no se eleve 2 °C la concentración de CO₂ no habría de superar las 400 ppm, lo que, además, derivaría en la acidificación del agua del mar (IPCC 2007; IPCC 2013). Las actividades humanas también son responsables de altos niveles de liberación de contaminantes en los ecosistemas acuáticos, tales como productos químicos sintéticos, contaminantes orgánicos persistentes, nutrientes, aceites, radionucleidos, metales pesados, patógenos, antibióticos, sedimentos, basura, etc. (Shahidul & Tanaka, 2004), provocando amplios cambios en la estructura de la comunidad fitoplanctónica como refleja la frecuencia en la aparición de floraciones de algas nocivas (HAB) (Hallagraeff, 2010), así como invasiones biológicas; ambos fenómenos son una consecuencia generalizada de cambio global (Diez *et al.*, 2012).

Los microorganismos fotótrofos microscópicos (fitoplancton) juegan un papel crucial en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas acuáticos, representando aproximadamente la mitad de la producción primaria de la tierra y son, también, de vital importancia para la regulación del clima y los ciclos biogeoquímicos (Falkowski *et al.*, 2008). Por lo tanto, cualquier cambio en la base de la cadena alimentaria acuática puede

tener consecuencias graves para todo el ecosistema. Por lo tanto, la predicción de la respuesta biológica al cambio global debe ser una de las tareas primordiales en la investigación de la biología evolutiva, siendo de gran interés para conocer qué mecanismos pueden ayudar a rescatar al fitoplancton de su posible extinción y cómo las poblaciones y las comunidades naturales van a evolucionar en respuesta al cambio climático.

La probabilidad de que los organismos se adapten a este cambio, potencialmente letal, depende de tres mecanismos diferentes. En primer lugar, la plasticidad fenotípica (aclimatación) permite la supervivencia cuando la población es sometida repentinamente a un ambiente estresante (Charmantier *et al.*, 2008). En segundo lugar, si se alcanzan los límites de la plasticidad fenotípica de las especies, puede tener lugar la sustitución de éstas, de modo que las que se adapten mejor a los ambientes nuevos proliferarán mejor, desplazando a las especies peor adaptadas (Ackerly, 2003). Por último, cuando la presión de selección es crítica la supervivencia y la adaptación dependen exclusivamente de la adaptación genética, a través de la selección de nuevos genotipos que surgen a través de mutación, la transferencia horizontal de genes, o de la recombinación (Belfiore & Anderson, 2001).

Aunque no hay duda sobre el hecho de que los cambios evolutivos dependen principalmente de la evolución adaptativa, hay otras fuerzas evolutivas que tradicionalmente no han sido tenidas en cuenta: el azar y la historia. Vale la pena intentar explicar por medio de un enfoque empírico cuál es la contribución real de cada componente evolutivo en el proceso de adaptación ante la presión antropogénica y es sorprendente la falta de experimentación para probar explícitamente este tema.

1.2 Objetivos

Los procedimientos experimentales que se muestran en este documento se han realizado con el propósito de alcanzar los siguientes objetivos:

- Dilucidar la importancia de los distintos componentes de la adaptación (evolución adaptativa, azar e historia) de los organismos del fitoplancton al cambio global.

- Determinar el origen de la adaptación a los cambios ambientales en organismos fitoplanctónicos, distinguiendo entre la adaptación fisiológica o genética.
- Investigar la máxima capacidad de adaptación de determinadas especies de fitoplancton al cambio global y la adaptación diferencial entre distintas especies.

Además, también se consideró el hecho de hacer frente a otros desafíos experimentales con los siguientes objetivos complementarios:

- Evaluar el uso potencial de las diferentes especies de fitoplancton resistentes a ciertos compuestos tóxicos en procesos biotecnológicos tales como son las técnicas de biorremediación.
- Determinar si el fitoplancton resistente introducido en un nuevo ecosistema puede llegar a ser considerado una especie invasora.

1.3 Resultados

Para la obtención de los resultados experimentales, en primer lugar se empleó un experimento basado en la propuesta teórica de Gould (1989), basada en "reproducir de nuevo la cinta de la vida" para poner a prueba la capacidad de repetición de la evolución y, de ese modo, evaluar los respectivos papeles de las fuerzas evolutivas en la adaptación a tal cambio ambiental. En segundo lugar, se empleó la técnica experimental conocida como el análisis de fluctuación donde se evaluaron los mecanismos (equilibrio mutación-selección) que permiten a los organismos fitoplanctónicos soportar la exposición continua a las fuentes antropogénicas. A continuación, el protocolo denominado *ratchet* o trinquete constituyó una forma novedosa de explorar, a través de un riguroso modelo experimental, los límites de la adaptación genética para adaptarse al aumento de los cambios derivados del antropoceno. Por último, se investigó una nueva técnica para manejar la identificación de los organismos tóxicos durante el desarrollo de las floraciones de algas nocivas.

El experimento de poblaciones de ancestrales y derivadas mostró que la contingencia histórica limitó fuertemente la evolución de la tasa de crecimiento y la cantidad de producción de toxina celular, aunque las fuerzas implicadas en la evolución no fueron iguales para ambos caracteres. En el primer caso, la tasa de crecimiento fue de 1.5 a 1.6 veces mayor en las condiciones derivadas que el medido en condiciones ancestrales. La adaptación genética explicó dos terceras partes de la adaptación total, mientras que la otra tercera parte fue una consecuencia de la adaptación fisiológica. Por otro lado, la evolución de la producción de toxina celular mostró un patrón de evolución atribuible al azar por mutaciones neutrales, debido a que las varianzas finales fueron significativamente más altas en la población derivada que las medidas en el inicio del experimento en la población ancestral. Aunque este estudio se podría considerar una simplificación de la realidad, se ha planteado la hipótesis de que las floraciones de algas nocivas se incrementen en el escenario futuro del cambio global; no obstante, no se pueden avanzar predicciones acerca de la toxicidad.

Los diversos análisis de fluctuación realizados demostraron que las células resistentes a los contaminantes antropogénicos en la mayoría de los experimentos llevados a cabo aparecieron como resultado de raras mutaciones, que se producen espontáneamente en las poblaciones naturales antes de la exposición a los agentes selectivos, en lugar de por adaptación específica o selectiva mediante mutaciones que aparecen en las respuesta al agente selectivo. Las tasas de mutación de organismo sensible a organismo resistente oscilaron entre 10^{-4} y 10^{-7} mutaciones por célula y por generación. También se ha encontrado que existe un equilibrio, que controla la presencia de estos mutantes en la población, entre la recurrente aparición de mutantes resistentes y su eliminación por selección natural, debido a que tienen menos eficacia biológica, también identificada como *fitness*, en comparación con el genotipo salvaje. En sólo tres ocasiones, donde la toxicidad fue extremadamente alta (la mayor concentración de lindano y la dosis de 10 mg/ L de TBT en *Prochloron* sp.) o la presión de selección límite (como el caso de la temperatura de 32,2 °C) las células no fueron capaces de alcanzar ningún tipo de adaptación. Adicionalmente, las células resistentes al lindano también se utilizaron para probar su potencial en la biorremediación de lindano del medio. Las células lindano-resistentes mostraron una gran capacidad para eliminar dicho compuesto (hasta un 99 %). Demostrándose que la biorremediación basada en el

empleo de células resistentes podría ser una gran oportunidad para la limpieza de los hábitats contaminados.

En relación con los experimentos de máxima capacidad de adaptación (“trinquete” o *ratchet*), en lo que se refiere a la presencia de sulfato de cobre, la dosis de 2,5 μM fue capaz de inhibir completamente el crecimiento de las tres cepas de *M. aeruginosa*, mientras que el crecimiento de las tres especies de clorofitas fue completamente inhibido por 12,4 μM . Habiéndose conseguido un aumento significativo de la resistencia a dicho contaminante en todas las poblaciones derivadas. Concretamente, la resistencia se multiplicó por cuatro en las cianobacterias y por vendidos en las clorofitas, observándose así una capacidad diferente para la adaptación al sulfato de cobre entre los dos grupos objeto de estudio, derivado principalmente de la diferencia en el grupo taxonómico y organización celular, ya que los organismos procariotas son más sensibles a los contaminantes antropogénicos que los eucariotas.

Por último, en relación al estudio del trabajo realizado con la cepa *Symbiodinium* Cepa C1 frente al aumento de la temperatura, el protocolo de *ratchet* fue iniciando en la temperatura óptima de crecimiento (26 °C) y aunque no se consiguió la adaptación genética a la temperatura más alta de las ensayadas, 32,2 °C, si se consiguió crecimiento con el valor inmediatamente inferior de 31,5 °C, gobernando en ello la aclimatación.

1.4 Conclusiones

Los estudios actuales demuestran que es posible obtener una imagen de la respuesta de las poblaciones de fitoplancton al cambio global mediante el diseño de sistemas experimentales que estudien los cambios evolutivos de estos microorganismos. Este hecho se concreta con las siguientes conclusiones:

- De acuerdo con la evolución de la tasa de crecimiento y la toxicidad celular en el dinoflagelado tóxico *A.minutum* se puede adelantar la hipótesis de que las floraciones tóxicas se incrementarán en el futuro cercano, pero no se pueden avanzar predicciones acerca de la toxicidad.

1. RESUMEN

- Las raras mutaciones preadaptativas y espontáneas que confieren resistencia frente a varios productos tóxicos y agentes estresantes parecen ser suficientes para asegurar la supervivencia de las poblaciones fitoplanctónicas en los ecosistemas, aunque los mutantes muestran una menor *fitness* o eficacia biológica.
- La máxima capacidad de adaptación de las clorofitas frente al sulfato de cobre es mayor que la de las cianobacterias.
- El límite adaptativo del *Symbiodinium* es de 32,2 °C hasta el momento ha sido imposible encontrar ningún mutante resistente a esta temperatura.



2. SUMMARY

2. SUMMARY

2.1 Introduction

Along the Earth's history, our planet has been marked by several periods of environmental crisis. The major global biotic depressions of the geological past were all caused by physical events and due to natural causes. These events are known as the five great mass extinctions. However, nowadays the Earth is losing around 30,000 species per year and the rate of extinction is now 30 times higher than in the past decade (Woodruff, 2001). This real situation has become an increasingly important issue to the scientific community who has called this new era as the sixth extinction. Additionally, the physically caused extinction events of the past apparently have no relationship with the current sixth extinction, which is mainly the result of human activities. One of the most worrisome impacts is the increase in atmospheric CO₂. CO₂ has gradually increased since pre-industrial levels, slightly higher than 250 ppm up to 380 ppm at present time. This is a limit situation since CO₂ concentration should not exceed 400 ppm if we do not want that the ocean surface temperature rises 2°C. Moreover, this would result in seawater acidification. (IPCC 2007, IPCC 2013). Human activities are also responsible for the release of high levels of pollutants in aquatic ecosystems, such as: synthetic chemicals, persistent organic pollutants, nutrients, oils, radionuclides, heavy metals, pathogens, antibiotics, sediments, litter and debris, etc. (Shahidul Islam & Tanaka, 2004). Extensive changes in community's structure can be responsible for the expansion of Harmful Algal Blooms (HABs) (Hallagraeff, 2010) and biological invasions, in turn, are a widespread consequence of global change (Diez et al., 2012).

Ubiquitous microscopic phototrophs (phytoplankton) play a crucial role in supporting aquatic ecosystems. They account for roughly half the global primary productivity on earth and have a great significance in both climate regulation and biogeochemical cycles (Falkowski et al., 2008). In consequence, any change at the bottom of the aquatic food web may have severe implications for the entire ecosystem. Therefore, the importance of experimental evolution in understanding and predicting the biological response to global change should be one of the main tasks in evolutionary biology research and it is of great interest to find out which mechanisms are expected to

2. SUMMARY

rescue phytoplankton from extinction and how natural populations and communities will evolve in response to climate change.

The likelihood that the organisms will deal with this potentially lethal change depends on three different mechanisms. Firstly, the phenotypic plasticity allows survival when a population is suddenly placed in a stressful environment (acclimation) (Charmantier et al. 2008). Secondly, if the limits of phenotypic plasticity of individual species are reached, species replacement may occur, and species with a better adaptation to novel environments will proliferate displacing the more poorly adapted species (Ackerly 2003). Finally, when the pressure of survival is critical, adaptation depends exclusively on genetics via clonal selection or selection of new genotypes arising through mutation, horizontal gene transfer, or recombination (Belfiore & Anderson, 2001).

Although there is little doubt about the fact that evolutionary changes depend mainly on adaptive evolution there are other evolutionary forces that traditionally have not been taken into account: chance and history. It is worthy to try to explain by means of an empirical approach which is the real contribution of each evolutionary component in the process of adaptation to the anthropogenic pressure. Despite that, it is surprising the lack of experimentation to explicitly test this topic

The experimental procedures reported in this study try to provide additional insights into the potential capacity of adaptation of microalgae and cyanobacteria under several environmental stressors. It is also an attempt to elucidate from an evolutionary point of view the response of phytoplankton when submitted under such environmental forces as the global change represents. For this purpose, an experiment based on the Gould's theoretical proposal (1989) was conducted at the first place. This surprisingly proposal was founded in "replaying life's tape" to test the repeatability of evolution and thereby evaluate the respective roles of the evolutionary forces in the study of adaptation to such environmental change. Secondly, a fluctuation analysis was the experimental method used for the evaluation of the mechanisms involved (fitness and mutation- selection balance) which allow phytoplankters to withstand continuous exposure to anthropogenic sources. The ratchet protocol constitutes a novel way to explore, through a rigorous experimental model, the limits that genetic adaptation offers

to adapt to increasing anthropogenic-induced changes. Finally, a new technique was performed to handle the identification of toxic organisms during the development of harmful algal blooms.

2.2 Objectives

- To disentangle the main components of evolution (adaptive evolution, chance and history) involved in the adaptation of some phytoplankton organisms to global change.
- To determine the origin of adaptation to environmental changes, making a distinction between physiological or genetic adaptation.
- To investigate the maximum adaptive capacity of certain phytoplankton to global change.

Complementary objectives:

Additionally, the fact to address the following experimental challenge was also considered:

- To assess the potential use of different phytoplankton species resistance to certain toxic compounds in biotechnological processes such as bioremediation techniques.
- To determine whether resistant phytoplankton introduced into a new ecosystem can be considered an invasive species.

2.3 Results

The ancestral and derived populations experiment showed that historical contingencies strongly constrained the evolution of growth rate and toxin cell quota, but the forces involved in the evolution were not the same for both parameters. Growth rate was 1.5-1.6 times higher than the one measured in ancestral conditions. Genetic adaptation explained $\frac{2}{3}$ of total adaptation while $\frac{1}{3}$ was a consequence of physiological adaptation. On the other hand, the evolution of toxin cell quota showed a pattern

2. SUMMARY

attributable to neutral mutations because the final variances were significantly higher than those measured at the start of the experiment. It has been hypothesized that harmful algal blooms will increase under the future scenario of global change. Although this study might be considered an oversimplification of the reality, it can be hypothesized that toxic blooms will increase but no predictions can be advanced about toxicity.

The several fluctuation analyses performed demonstrated that in most of the experiments conducted resistant cells to anthropogenic pollutants appeared as a result of rare mutations, which occur spontaneously in natural populations prior to exposure to the selective agents rather than by specific adaptation or post selective mutations appearing in response to the selective agent. The mutations' rate from sensitivity to resistance ranged between 10^{-4} and 10^{-7} mutations per cell per generation. It has also been found that there is a balance, which controls the presence of these mutants in the population, among the recurrent appearance of resistant mutants and its elimination by natural selection, because they have less biological effectiveness, also identified as *fitness* in comparison with the wild genotype. Only three times, when the toxicity was extremely high (the highest concentration of lindane and 10 mg/L of TBT in *Prochloron* sp) or when the selection pressure was limit (32,2°C in the *Simbyodinium* Clade C1), the cells were not able to achieve any kind of adaptation. Additionally, the potential of microalgae to remove lindane was tested using lindane-resistant cells. These resistant cells showed a good lindane removal capacity (up to 99% lindane was removed). Apparently, bioremediation based on resistant cells could be a great opportunity for cleaning up polluted habitats.

In relation to the Ratchet experiment, initially, copper sulphate doses of 2.5 μ M were able to inhibit growth completely in three strains of *M. aeruginosa*, whereas growth of three species of chlorophytas was completely inhibited at 12.4 μ M. However, a significant increase in resistance to copper sulphate was achieved in all derived populations during the ratchet experiment. Furthermore, a different capacity for copper sulphate adaptation was observed between the chlorophytas and the cyanobacteria. The chlorophyceans *D. chlorelloides* and *S. intermedius* were able to adapt up to 270 μ M copper sulphate. On the contrary, 10 μ M of copper sulphate was the highest concentration that *M. aeruginosa* strains were able to tolerate, although one of the replicates from strain Ma3D adapted to 30 μ M.

Finally, in the second ratchet performed versus temperature increase with the strain *Symbiodinium* Clade C1 starting the protocol at the optimum growth temperature of 26 °C was not achieved genetic adaptation to the highest temperature tested of 32.2 °C ruling acclimation in step immediately below 31.5 °C.

2.4 Conclusions

The current studies demonstrate that it is possible to obtain a picture of the response of phytoplankton populations to global change by designing experimental systems to study the evolutionary changes of these microorganisms. The following conclusions can be drawn from the present study:

- According to the evolution of growth rate, it can be hypothesized that toxic blooms will increase in the near future but no predictions can be advanced about toxicity.
- Rare spontaneous mutations conferring resistance against several toxics seem to be enough to assure survival of phytoplankters populations in polluted or toxic waters, although the mutants show less *fitness*.
- The maximum resilience against copper sulfate is greater in the green algae than cyanobacteria. Furthermore, the adaptive limit in *Symbiodinium* was 32.2 °C since it was impossible to find any resistant mutant who achieved this temperature.



3. INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Historia del clima en la tierra

Resumir en unos párrafos los 4.500 millones de años (Ma) de historia del clima de nuestro planeta es una tarea tremendamente ambiciosa; no obstante, merece la pena destacar los rasgos climáticos más significativos de sus etapas geológicas, también conocidas como eones (figura 3.1), lo que nos puede ayudar a centrar adecuadamente nuestra situación actual. Hasta el momento en el que nos encontramos, referenciado como momento cero, se han sucedido cuatro eones, los tres primeros (Hadeense, Arqueozoico y Proteozoico) han supuesto el 87 % de la historia terrestre, el cuarto o Fanerozoico, que comenzó hace 542 Ma, se divide a su vez en tres eras denominadas Paleozoico, Mesozoico y Cenozoico (figura 3.2.). Las eras, a su vez, se dividen en periodos y éstos en épocas; el primer periodo del Paleozoico recibe el nombre de Cámbrico, por lo que se denomina Precámbrico todo el tiempo anterior a él (Dobzhansky *et al.*, 1980; Levin, 2003).

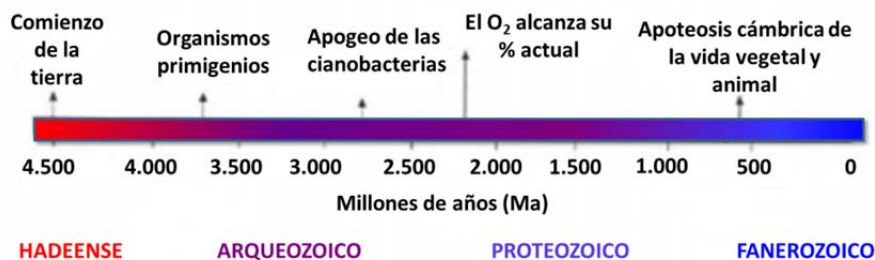


Figura 3.1. Escala geológica del tiempo en la Tierra desde sus orígenes.

ERA	PERIODO (Comienzo en Ma)	ÉPOCA (Comienzo en Ma)
Cenozoico	Cuaternario	Holoceno (0,01)
	Neógeno	Pleistoceno (1,8)
	Paleógeno	
Mesozoico	Cretácico (145)	Plioceno (5)
	Jurásico (200)	Mioceno (23)
	Triásico (251)	
	Pérmico (299)	
Paleozoico	Carbonífero (359)	Oligoceno (34)
	Devónico (416)	Eoceno (56)
	Silúrico (447)	Paleoceno (65)
	Ordovícico (488)	
	Cámbrico (542)	

Figura 3.2. Eras, periodos y épocas en que se divide el eón Fanerozoico (Levin, 2010)).

En los primeros millones de años se produjo un incesante bombardeo de meteoritos que liberaban gran cantidad de energía, otro importante flujo energético procedía de la desintegración de elementos radiactivos; por el contrario, la radiación solar era inferior a la actual. Poco a poco la temperatura fue bajando y el agua líquida fue ganando la partida al vapor. El aire apenas contenía trazas de oxígeno, ya que el que arrojaban los volcanes y el que era producto de la disociación del agua se consumía enseguida por gases reductores como el monóxido de carbono, el hidrógeno o el metano; además, las rocas, ricas en óxido ferroso también lo consumían para formar óxido férrico. Con la aparición de organismos que practicaban la fotosíntesis, fundamentalmente cianobacterias, se rompió el equilibrio que había mantenido baja la concentración del oxígeno atmosférico, esto ocurrió al comienzo del eón Arqueozoico, hace unos 3.800 Ma. No obstante, la concentración del oxígeno atmosférico aumentaba muy lentamente debido su continuo consumo por la oxidación mineral, no obstante a principios del Proteozoico la fotosíntesis ya ganó la partida al resto de procesos que consumían oxígeno alcanzándose niveles comparables a los actuales (Sleep, 2001).

Posteriormente, la producción de ozono por radiación solar contribuiría a que la vida fuera imponiéndose en los océanos y la superficie de los continentes. Este proceso supuso, también, la disminución de los gases efecto invernadero, principalmente dióxido de carbono (por la proliferación de las cianobacterias y del fitoplancton marino) y el metano (por reacción con el oxígeno y disminución de las bacterias metanogénicas). Este hecho, a su vez, abrió la posibilidad de producción de glaciaciones, principalmente al final del Proterozoico (Neoproterozoico) según rocas datadas entre 750 y 580 Ma (Levin, 2010). En este sentido, la teoría más extrema (*snowball Earth*) es que fueron glaciaciones globales, o casi globales, en las que la Tierra llegó a convertirse en una gran “bola de nieve” (Jenkins & Smith, 1999), debido a la reducción drástica del dióxido de carbono y a reflexión de la luz por parte del hielo, con la consecuente pérdida de energía solar, aunque otras hipótesis apuntan a un cambio drástico en la oblicuidad del eje terrestre (Williams *et al.*, 1998) o a cambios en la transparencia en el espacio que separa la tierra del sol. El final de estas glaciaciones sobrevino por una abrupta y gigantesca actividad volcánica que elevó la concentración de CO₂ y por la desestabilización de bolsas de metano atrapado en cristales de hielo (Jacobsen, 2001).

No obstante, los microorganismos fitoplanctónicos estaban preparados para sobrevivir y, gracias a lo cual, con la llegada del Fanerozoico (del griego *faneros* “lo que aparece” y *zoe* “vida”) se produjo la explosión cámbrica de la vida, muy probablemente propiciada por cambios en la geografía de mares y continentes con la salida de aguas termales portadoras de elementos químicos en solución (Levin, 2010). Sin embargo durante el Fanerozoico se produjeron cinco grandes extinciones con un elevado porcentaje de especies desaparecidas (tabla 3.I.).

Tabla 3.I. Las cinco grandes extinciones del Fanerozoico (Hallan & Wignam, 1997).

Episodio/transición	Edad (Ma)	Especies extintas (%)
Ordovícico/Silúrico	428	85
Devónico Final	367	82
Pérmico/Triásico (P/T)	250	96
Triásico/Jurásico	202	76
Cretácico/Terciario (K/T)	65	70

Huellas de la glaciación del Ordovícico aparecen, por ejemplo, en Mauritania producidas por la erosión del lecho rocoso con el avance de los glaciares. La siguiente extinción se produjo hace unos 367 Ma debido a que al haber sido secuestrado en los sedimentos una gran cantidad de carbono orgánico, procedente del CO₂ atmosférico, los niveles de este gas invernadero disminuyeron y el clima se enfrió entrando en un nuevo periodo glacial. Pero lo peor ocurrió hace unos 250 Ma, en la transición de Paleozoico al Mesozoico, con la catástrofe P/T, dando lugar a uno de los desastres ecológicos más duros que ha sufrido el planeta (*The Great Dying*), desapareciendo un elevadísimo número de especies marinas y vertebrados terrestres. Las teorías sobre las causas de esta catástrofe son variadas pero las de mayor peso son dos: el choque de un asteroide y la oscuridad provocada por erupciones volcánicas masivas de SO₂.

Otra gran extinción comenzó a finales del Triásico, hace unos 208, cuando un gran continente denominado Pangea (origen de los continentes actuales) comenzó a fracturarse, expulsando gigantescas coladas de basaltos y gases provocando importantes cambios en la composición atmosférica que derivaron en lluvia ácida, junto con un incremento de la temperatura por el aumento de los niveles de CO₂ (Ward *et al.*, 2001). La progresiva ruptura de Pangea provocó durante todo el Jurásico un clima más

húmedo, el nivel del mar comenzó a ascender y el agua oceánica inundó grandes regiones continentales creando nuevos mares, lo que, a su vez, hizo disminuir el albedo planetario provocando un clima global más cálido, con temperaturas mucho más altas que las actuales, como sugieren algunos fósiles de la flora de la Antártida.

Al final del Cretácico en su transición al Cenozoico, hace 65 Ma, se produjo la última gran extinción registrada. En el mar desaparecieron los amonites y gran cantidad de plancton y en los continentes los dinosaurios (Eldredge, 2001). Las causas de esta gran extinción son confusas y existen diferentes teorías e hipótesis al respecto. La primera está a favor de que la causa fue una colisión entre la Tierra y un meteorito, lo que pudo ser en la ciudad mejicana de Chicxulub, frente a las costas de la península de Yucatan, arrasando, por la oblicuidad del impacto, la costa sur de Estados Unidos donde existen señales de tsunamis gigantescos. Se ha especulado con la posibilidad de que el polvo, rico en SO_2 , causara durante mucho tiempo oscuridad, frío y lluvia ácida, afectando por ello a la actividad fotosintética. Además, tras el choque, posiblemente, se esparciera por la superficie de la Tierra iridio extraterrestre procedente del propio asteroide; de hecho este metal aparece en concentraciones altas en estratos arcillosos que señalan el final del Cretácico, como los de Gubbio en Italia (Álvarez *et al.*, 1980). Un trabajo muy reciente publicado por Renne y colaboradores en la revista Science parece que ratifica esta idea y establece la sincronía entre las extinciones en masa y un impacto entre el límite Cretácico-Paleógeno en Chicxulub con datos de Ar-40/Ar-39 en distintas bentonitas (Renne *et al.*, 2013).

Sin embargo, otras opiniones apuntan a que fueron las erupciones volcánicas la causa principal de la catástrofe K/T; según esta teoría los dinosaurios no aguantaron el enfriamiento producido por el velo formado en la atmósfera por los aerosoles sulfurosos de los volcanes, generadores, a su vez, de lluvia ácida. Testigos de ello son las plataformas basálticas del Decán en la India que se formaron en aquel momento (Uriarte, 2003). Otro dato que apoya la teoría de que la quinta gran extinción fuera causada por vulcanismo interno se debe a Zhao, según este autor este fenómeno provocó la transmisión a los océanos de material magmático (rico en metales tóxicos como Ir, Os, Pt, Ru, etc.) mediante plumas de manto (Zhao, 2007). En cualquier caso, se produjeron grandes perturbaciones de los ecosistemas lo que implicó la total inhibición

de la fotosíntesis entre otros muchos efectos que, al final, desembocaron en una gran pérdida de biodiversidad.

Por último, la evolución del clima en el Cenozoico, que comprende las eras terciaria y cuaternaria (figura 2.2.), aunque es compleja, podría resumirse en un comienzo de clima cálido que paulatinamente fue enfriándose, aunque existieron varios eventos de duración muy corta en los que las temperaturas se dispararon tanto hacia arriba como hacia abajo. El último periodo frío, denominado de *Younger Dryas* acabó más bien bruscamente, hace unos 11.500 años, cuando las temperaturas subieron definitivamente poniendo fin a la última glaciación. Finalizaba el Pleistoceno y comenzaba el último periodo interglacial del cuaternario: el Holoceno.

Hemos comprobado que la historia de la vida de la tierra ha estado salpicada por una serie de episodios catastróficos durante los cuales la biosfera se ha convulsionado y, en lapsos de tiempo relativamente cortos, la diversidad se redujo de forma drástica. Cada una de las extinciones en masa estaba caracterizada por la desaparición de la mayor parte de vida sobre la tierra; después, sobre los nichos ecológicos despoblados, surgían otros grupos de organismos que aprovechaban la casi ausencia de competencia ecológica para expandirse (Martin, 1999). La vida, persistentemente, volvía a abrirse camino. Quizás siempre quedaban lugares bajo el hielo donde la luz podía penetrar, o fondos marinos donde la actividad hidrotermal ayudara a conservar algo de calor. Muy probablemente los organismos menos desarrollados fueran los que con mayor facilidad se adaptaron a las condiciones más adversas. En este sentido, aunque muchos microorganismos fitoplanctónicos se extinguieron, también es cierto que se han encontrado vestigios de microorganismos primigenios que, por medio de diferentes técnicas de seguimiento de la transformación de ciertos nucleídos radiactivos, se han podido datar en más de 3.000 Ma (Margalef, 1992) y que eran muy semejantes a las actuales cianobacterias.

3.2. Antropoceno

Ya en los tiempos actuales, la actividad humana está alterando irremediablemente el planeta lo que ha suscitado la idea de que se esté entrando en una nueva era

geológica. Durante los últimos 11.500 - 12.000 años, la tierra se ha encontrado en una época, que los geólogos denominan Holoceno, dónde el clima se ha mantenido estable. Esto ha permitido al ser humano desarrollar actividades como la agricultura y la ganadería; asimismo, le ha hecho posible conseguir hitos como la revolución industrial y el gran desarrollo tecnológico de nuestros días. Sin embargo, el hombre está introduciendo con sus actividades modificaciones en los cuatro subsistemas fundamentales del clima: atmósfera, biosfera, hidrosfera y litosfera, cuyas consecuencias vamos a sufrir en el futuro. Así, las emisiones industriales están modificando la composición del aire, incrementando el efecto invernadero y destruyendo el ozono estratosférico; en relación a la biosfera la biodiversidad se reduce por nuestra culpa, las selvas forestales se destruyen y alteramos genéticamente tanto especies animales como vegetales; en relación a la hidrosfera estamos elevando el nivel del mar como consecuencia del calentamiento global, acidificando el océano y provocando la fusión de los glaciares; por último, en la litosfera estamos cambiando patrones de erosión y sedimentación, al alterar por ejemplo los perfiles de los ríos, y favoreciendo la desertización (Martin, 1999). En definitiva, estamos modificando drásticamente el sistema que nos ha generado y que ha permitido nuestra expansión como especie. Todo ello, para numerosos autores (Slaughter, 2012; Biermann *et al.*, 2010), sugiere que se ha entrado en una nueva época denominada “Antropoceno”. Esta nueva denominación fue acuñada por primera vez por el premio Nobel de Química Paul Crutzen, convencido, ya hace más de una década, de que el planeta ha cambiado esencialmente por "la acción directa del hombre" (Crutzen & Stoermer, 2000).

Las cinco extinciones masivas de especies que, a lo largo de la historia, ha sufrido la tierra fueron provocadas por causas naturales o físicas, las cuales desembocaron en grandes perturbaciones en los ecosistemas y en graves pérdidas de biodiversidad. La sexta gran extinción es en la que, actualmente, puede afirmarse que se encuentra la Tierra, lo cual puede deducirse si se tiene en cuenta que, en el último siglo, desaparecieron treinta mil especies y, en estos momentos, el ritmo de desaparición de otras muchas especies es quinientas veces más alto que en siglos anteriores (Woodruff, 2001). Este fenómeno es un evento contrastadamente provocado por causas antropogénicas.

Está más o menos claro que los humanos son la causa directa del estrés de los ecosistemas y de la destrucción de las especies. Son factores fundamentales en ello: el desarrollo desmesurado de la construcción, con la consecuente transformación del paisaje, la agricultura, la ganadería, la contaminación, la introducción de especies exóticas y el crecimiento desordenado de la población humana en algunos puntos del planeta, entre otros. Así Richard Leakey y Roger Lewin en su obra “La sexta extinción” (Leakey & Lewin, 2008) apuntan que los humanos ponemos en peligro la existencia de otras especies de tres maneras diferentes, la primera es la explotación directa como la caza o la pesca desmesuradas, la segunda es el destrozo biológico que se produce a raíz de la introducción de especies foráneas en ecosistemas nuevos y la tercera es destruir y fragmentar hábitats vírgenes con el continuo crecimiento de poblaciones humanas.

Estos mismos autores presentan la sexta extinción como el primer evento global documentado de desaparición de especies y que tiene una causa biótica en vez de una causa física o natural como ocurrió en las anteriores. Si durante periodos de extinción normal, la velocidad media de pérdida de especies es de una cada cuatro años, en estos momentos ese dato se ha visto multiplicado por 120.000, lo que podría compararse con cualquiera de las cinco grandes crisis biológicas de la historia del planeta, aunque esta vez la causa no está en el retroceso del nivel del mar, ni en el vulcanismo, ni en la caída de un asteroide, la causa está en uno de los pobladores de la Tierra, el *Homo sapiens*.

Desde los inicios de la revolución industrial, en el siglo XVIII, el hombre ha venido incorporando a la atmósfera diversos tipos de gases contaminantes, entre los que destacan cuatro de ellos por ser especialmente agresivos al ser de larga permanencia: anhídrido carbónico, metano, óxido nitroso y los halocarbonos (grupo de gases que contienen flúor, cloro o bromo). Concretamente, las concentraciones mundiales en la atmósfera de los tres primeros han aumentado exponencialmente desde 1750 y, en 2005, las concentraciones de todos ellos excedieron considerablemente del intervalo de valores naturales de los últimos 10.000 años (figura 3.3.).

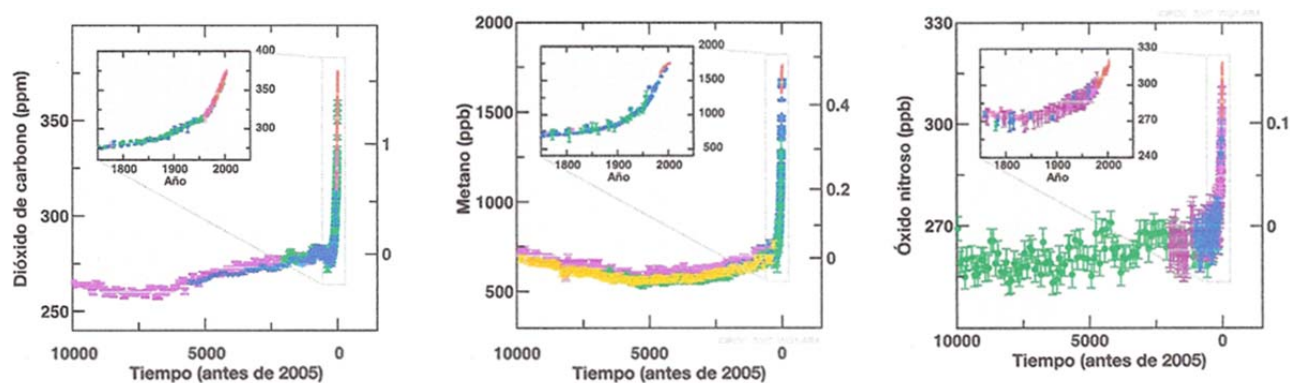


Figura 3.3. Concentraciones de CO_2 , CH_4 y N_2O en la atmósfera durante los últimos 10.000 años (recuadros grandes) y desde 1750 (recuadros interiores), (IPCC, 2007).

Por lo que respecta a España, en los últimos 13 años se han duplicado las emisiones de CO_2 y, en menor extensión aunque también de manera significativa, las de metano y óxido nítrico. Cuantitativamente hablando, el contaminante atmosférico que tiene una mayor importancia es el dióxido de carbono ya que según los datos del Informe de Síntesis de 2007, último de los cuatro elaborados por el IPCC (Panel Intergubernamental para el Cambio climático), este gas llegó a representar en la década pasada más de las tres cuartas partes del total de las emisiones mundiales de gases de efecto invernadero (GEI) antropogénicas (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, España). Si se tiene en cuenta la parte proporcional de diversos sectores en las emisiones totales de CO_2 , se constata que son el suministro energético que quema combustibles fósiles y la industria las áreas de actividades humanas que suman el 45,3 % del total de las emisiones, otras importantes son la agricultura, la silvicultura y el transporte.

Las consecuencias inmediatas más graves de la presencia de estos contaminantes en la atmósfera son la elevación de la temperatura del planeta, además del secuestro de CO_2 en el océano lo que, como se justificará más adelante, deriva en una disminución del valor de su pH. Por otro lado, debido al desarrollo de fertilizantes agrícolas, se ha aumentado, además, la cantidad de nitratos en los ecosistemas continentales (Peña-Haro *et al.*, 2010), provocando el fenómeno denominado eutrofización. Por su parte, las actividades mineras (Bhattacharya *et al.*, 2012) e industriales (Rawat *et al.*, 2009; Al Yaqout, 2003) también generan otros muchos residuos contaminantes que son liberados sin control a los ecosistemas, aumentando significativamente sus concentraciones en los

suelos y en las aguas del planeta. Todos estos cambios plantean grandes retos de adaptación en los seres vivos, teniendo éstos que acomodarse a las nuevas circunstancias, lo que derivará en la pérdida de determinadas especies más sensibles las cuales habrán de ser sustituidas por otras más resistentes, todo ello propiciará que se produzcan grandes cambios en las diversas comunidades del planeta. En relación a los océanos, en la figura 3.4., se resumen las distintas causas de origen antropogénico que afectan a la estructura de los ecosistemas oceánicos y la población fitoplanctónica.

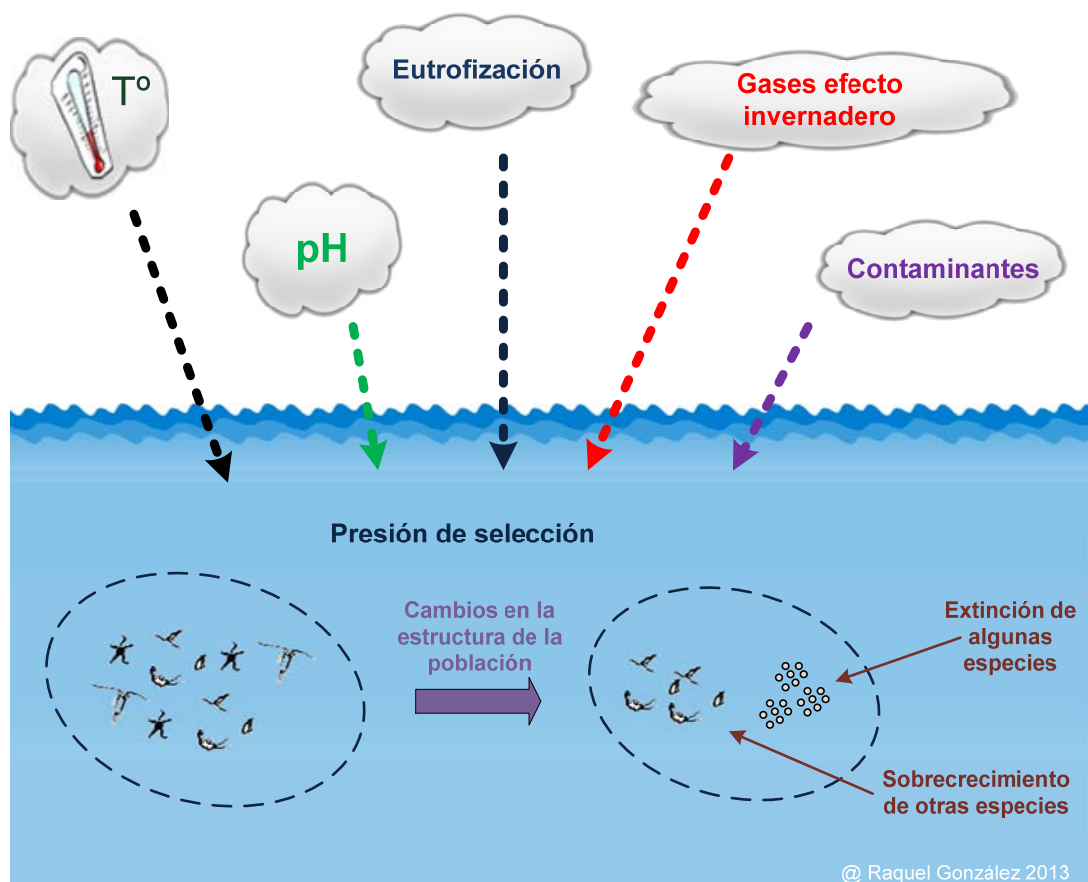


Figura 3.4. Agentes de origen antropogénico que alteran los ecosistemas.

3.2.1. Eutrofización

El nitrógeno es el elemento químico más abundante de la atmósfera terrestre con una proporción en volumen de casi 80 % pero, además, es uno de los componentes esenciales de muchas biomoléculas imprescindibles para la vida (como, por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, etc.) y ocupa el cuarto lugar, detrás del carbono, oxígeno e

hidrógeno, de los elementos químicos más comunes en los tejidos vivos (Campbell, 1990).

Durante los últimos dos siglos, y especialmente en las últimas cinco décadas, los seres humanos han alterado sustancialmente el ciclo global de nitrógeno (así como los ciclos globales de otros elementos químicos) aumentando tanto la disponibilidad como la movilidad de nitrógeno a lo largo de grandes regiones de la Tierra (Galloway & Cowling, 2002). El aporte excesivo a los ecosistemas de aguas residuales urbanas y agropecuarias desencadena en ellos el fenómeno conocido como *eutrofización*. Dichos vertidos suelen estar cargados con bionutrientes tales como nitrógeno y fósforo bajo formas tanto orgánicas (aminoácidos, proteínas, etc.) como inorgánicas (nitritos, nitratos, fosfatos, etc.), lo que provoca que en los sistemas eutrofizados se potencien el desarrollo, el mantenimiento y la proliferación de los productores primarios tales como fitoplancton, algas bentónicas y macrófitos, principalmente (Smith, 2003).

Se estima que durante las últimas cuatro décadas, las actividades humanas han incrementado los flujos de nitrógeno en forma de nitrato, principalmente, de seis a ocho veces en las aguas costeras del noreste de EE.UU, de cuatro a cinco veces en las aguas costeras del Golfo de México y de seis a veinte veces en los ríos europeos que desembocan en el Mar del Norte, vinculando estos mayores flujos de nitrógeno a un mayor número de floraciones masivas de algas (Smith, 2003; Rabalais *et al.*, 2002; Howarth *et al.*, 2000; Vitousek *et al.*, 1997).

La eutrofización de los ecosistemas acuáticos puede causar graves efectos ecológicos y toxicológicos que están directa o indirectamente relacionados con la proliferación incontrolada de los productores primarios. Esta proliferación y la subsiguiente descomposición de la materia orgánica, por lo general, conducen a una disminución de la concentración del oxígeno disuelto en las aguas más profundas y en el sedimento. Dicha situación trae consigo la generación de grandes mortandades de peces e invertebrados, como consecuencia de la hipoxia o anoxia, y en reducciones significativas en el hábitat, la alimentación, el crecimiento y la reproducción de estos organismos acuáticos (Anderson *et al.*, 2002; Breitburg, 2002).

La disminución de la concentración del oxígeno disuelto en el medio acuático también puede promover la formación de compuestos reducidos, tales como sulfuro de hidrógeno (H_2S) y, como resultado, en un aumento de los efectos adversos en los animales acuáticos (Breitburg, 2002; Wetzel, 2001; Díaz & Rosenberg, 1995). Así, por ejemplo, el sulfuro de hidrógeno es un compuesto muy tóxico que puede provocar una mortalidad aguda en los animales acuáticos en concentraciones relativamente bajas al afectar al sistema nervioso (Ortiz *et al.*, 1993). Adicionalmente, la eutrofización puede aumentar la frecuencia, duración y extensión de floraciones masivas de algas tóxicas; éste es un fenómeno global que está ocurriendo más frecuentemente en las dos últimas décadas y que, también, puede derivar en mortalidades masivas de animales acuáticos (Anderson *et al.*, 2002). Por último, y no por ello menos grave, la eutrofización altera la relación N/P de los ecosistemas acuáticos siendo esto capaz de inducir múltiples efectos en la biomasa y composición del fitoplancton (Smith, 2003).

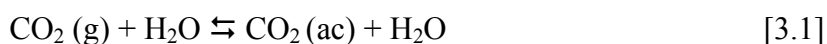
3.2.2. Acidificación de los océanos

El aumento de la concentración de dióxido de carbono atmosférico (CO_2), como consecuencia de las actividades humanas, es una de las principales causas del calentamiento global y la acidificación de los océanos (Caldeira & Wickett, 2003, 2005; Orr *et al.*, 2005; Feely *et al.*, 2004). Este incremento es reconocido como un importante impulsor de los cambios en los sistemas biológicos y ciclos biogeoquímicos (Lovejoy & Hannah, 2005).

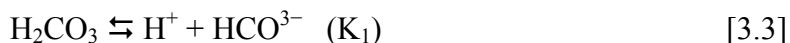
Durante los últimos 250 años, los niveles de dióxido de carbono atmosférico aumentaron cerca de un 40 %, pasando de los niveles preindustriales de unos 280 ppmv (partes por millón en volumen) a casi 384 ppmv en 2007 (Solomon *et al.*, 2007). Esta tasa de aumento, impulsada por la combustión de combustibles fósiles y la deforestación, es de entorno a un orden de magnitud más rápida que la que se ha venido produciendo durante millones de años (Doney & Schimel 2007); además, la concentración actual es la mayor concentración observada en la Tierra en, al menos, los últimos 800.000 años (Lüthi *et al.*, 2008). El aumento de CO_2 en la atmósfera se ve atenuado por la absorción oceánica, que retiene casi un tercio del carbono

antropogénico de la atmósfera (Sabine *et al.*, 2004; Sabine & Feely 2007), y sin lo cual la cantidad de CO₂ en la atmósfera sería, actualmente, de aproximadamente 450 ppmv.

El sistema del carbono inorgánico es uno de los equilibrios químicos más importantes en el océano y es el gran responsable de controlar el pH del agua del mar. Cuando el CO₂ se disuelve en el agua, se forma ácido carbónico (H₂CO₃) según las reacciones [3.1] y [3.2]:



Posteriormente, el ácido carbónico puede disociarse en un primer equilibrio generando un catión de hidrógeno (H⁺) y un anión bicarbonato (HCO³⁻), a su vez el HCO³⁻ tiene la posibilidad de disociarse nuevamente en otro catión hidrógeno y un anión carbonato (CO₃²⁻), según las reacciones [3.3] y [3.4], siendo la primera disociación mucho mayor que la segunda (pK₁ = 6,5 y pK₂ = 10,2), lo que conduce a una concentración del anión bicarbonato mayor que la del anión carbonato (Burriel, *et al.*, 1975):



La solubilidad del CO₂ en el agua no es muy elevada; no obstante, en agua de mar ésta aumenta significativamente. El motivo reside en que la disolución del dióxido de carbono depende fuertemente del pH y éste en el agua, a su vez, está regulado por el balance entre las cargas de los iones positivos y negativos que, normalmente, es más favorable para los primeros (alcalinidad). Por esta razón el sistema carbonato se desplaza hacia la formación de más los iones negativos (HCO³⁻, CO₃²⁻) con el objeto de compensar dicho balance; el resultado es la disolución de una mayor cantidad del gas carbónico atmosférico.

Adicionalmente, el CO₂ disuelto en el agua puede ser el responsable de la disminución de los iones carbonato ya que la reacción entre éste, el dióxido de carbono y el agua produce nuevos iones bicarbonato (reacción [3.5]):



Por lo tanto, el efecto neto de la adición de CO₂ al agua de mar es aumentar la concentración de HCO₃⁻ y, a la vez, disminuir la concentración de CO₃²⁻, a lo que se le suma el incremento de iones hidrógeno con el consiguiente descenso del pH (Feely *et al.*, 2004).

Desde el inicio de la Revolución industrial el pH del agua de mar ha descendido 0,1 unidades, lo cual equivale a un incremento del 30 % en la concentración de los iones H⁺ (Fabry *et al.*, 2008). Si las predicciones del Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPCC 2007) son acertadas, el pH podría haber disminuido entre 0,3 y 0,4 unidades a finales de este siglo (Caldeira & Wickett, 2005). El aumento en las concentraciones de CO₂ puede afectar muy negativamente a los organismos marinos, provocando una gran desestabilidad en los ecosistemas. Las especies más afectadas son las especies que forman estructuras calcáreas, ya que dependen de los iones CO₃²⁻ y de los iones Ca²⁺ para formar las placas de carbonato cálcico que componen su estructura, entre ellas se encuentran corales, moluscos, equinodermos, algunos crustáceos, plancton foraminífero y los cocolitofóridos. Además, la acidificación también puede provocar efectos directos en la fisiología y reproducción de muchos animales provocándoles hipercapnia (acidificación interna del organismo). En resumen, la estructura general y el funcionamiento de los ecosistemas pueden verse afectados gravemente como consecuencia de que la base del ecosistema marino, como lo es la comunidad planctónica, se alterara seriamente (Fabry *et al.*, 2008).

3.2.3. Calentamiento global

El calentamiento del planeta es actualmente una realidad que representa otro reto adaptativo a los sistemas biológicos de la Tierra. Durante el siglo pasado la temperatura del planeta subió una media de 0,6 °C (Houghton *et al.*, 2001). Actualmente, gracias al

gran desarrollo de la tecnología se puede predecir el ritmo de aumento de temperatura que va a seguir produciéndose en nuestro planeta durante los próximos años. Existen modelos teóricos informatizados, como el conocido con las siglas SRES (Special Report on Emission Scenarios), que anuncian los posibles escenarios futuros desde el año 2000 al 2100 sobre el aumento de CO₂ atmosférico y la temperatura, basándose en una serie de variables como son el crecimiento de la población, el desarrollo tecnológico, económico, medioambiental, de infraestructuras, etc. Según puede deducirse de la aplicación de dicho modelo (figura 3.5.), el escenario más alentador identificado con la siglas B1, basado en las bajas emisiones y medidas de control, augura un aumento medio de 1,8 °C; por contra, el escenario más desfavorable al que se le asignan las siglas A1F1 que supone altas emisiones de CO₂ y escasas medidas de control, predice un aumento medio de 4 °C (IPCC 2007).

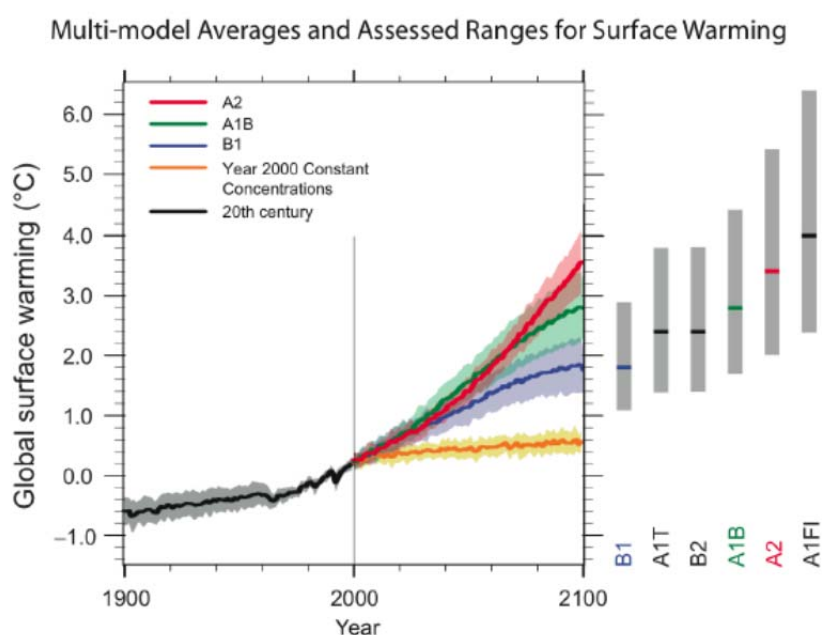


Figura 3.5. Representación gráfica del aumento del CO₂ según los distintos escenarios vaticinados por SRES.

Este vaticinado calentamiento va a conducir, irremediablemente, a alterar las interacciones bióticas de los ecosistemas, incluyendo desplazamiento de especies, cambios en la fenología y cambios en la composición de la comunidad de los ecosistemas (De Senarpont Domis *et al.*, 2007; Reuman *et al.*, 2014). En relación a la adaptación del fitoplancton a las presiones medioambientales provocadas por el aumento de temperatura, Huertas y colaboradores, en el 2011, investigaron la máxima

capacidad de adaptación de doce especies fitoplanctónicas pertenecientes a los cuatro grandes grupos de fitoplancton (agua dulce, agua costera, agua oceánica y corales) al calentamiento global, deduciéndose que, dependiendo de la ploidía, el hábitat, el grupo taxonómico y la tasa de crecimiento, había especies que eran más resistentes que otras a dicho aumento. Esta diferencia en la capacidad de adaptación de las especies puede llegar a provocar cambios en la composición de la comunidad planctónica debido al remplazo de las especies más sensibles por otras más resistentes.

Este fenómeno está produciendo unos efectos claramente visibles en los ecosistemas marinos y un claro ejemplo de ello es la Gran Barrera de Coral australiana, por la especial vulnerabilidad que presenta a cambios de este tipo. Los arrecifes de coral deben su éxito funcional a la simbiosis con dinoflagelados intracelulares del género *Symbiodinium* (zooxantelas) que suministran hasta el 95 % de las necesidades energéticas del coral (Muscatine & Porter, 1977). Los corales son sensibles incluso a pequeñas variaciones de temperatura, pudiendo desembocar en la ruptura de la obligada simbiosis entre las células de coral y los dinoflagelados endosimbiontes. Una consecuencia directa de dicha ruptura es una progresiva decoloración de los tejidos del coral debido a la pérdida de la zooxantela o de sus pigmentos, este proceso es conocido como blanqueamiento o *bleaching*. Durante los veranos, inusualmente calurosos, se observan amplios fenómenos de *bleaching* a lo largo de las barreras de coral repartidas por toda la geografía mundial y, en particular, la australiana, pudiendo causar grandes mortalidades en masa de los corales. En una escala mundial, los arrecifes de coral actuales han sufrido grandes reducciones en la cobertura coralina (Gardner *et al.*, 2003; Bruno & Selig, 2007; Sweatman *et al.*, 2011) y se estima que, en los próximos 10 - 20 años, el 15 % de todos los corales se encontrarán amenazados (Wilkinson, 2008). En definitiva, la capacidad de los arrecifes de coral para sobrevivir a los aumentos de la temperatura dependerá, en gran medida, de la capacidad de sus hospedadores para adaptarse a las temperaturas extremas previstas para las próximas décadas (Mieog *et al.*, 2009; Abrego *et al.*, 2008).

3.2.4. Contaminantes de origen antropogénico

Las actividades humanas, con la consecuente producción y emisión de sustancias contaminantes, son una de las principales causas de estrés y alteración de los ecosistemas acuáticos. En este sentido, el desarrollo de la agricultura intensiva, el crecimiento constante de la población, la gran expansión de las actividades industriales y tecnológicas, entre otras, han aumentado drásticamente la ingente cantidad de compuestos tóxicos vertidos a los ecosistemas. Los principales contaminantes emergentes derivados de los asentamientos humanos son: contaminantes orgánicos persistentes (como los organoclorados, organofosforados, etc.), metales pesados, hidrocarburos, residuos farmacológicos (principalmente antibióticos), nutrientes en exceso (tales como fósforo y nitrógeno), sedimentos, basura y escombros (Williams, 1996).

La liberación incontrolada de estas sustancias tóxicas puede tener dos efectos sobre los organismos:

i) Efectos directos, derivados de la propia toxicidad del compuesto, como por ejemplo, la posibilidad de reducir la abundancia de algún microorganismo por sus efectos letales. En este sentido, algunas especies pueden ser tolerantes a la presencia del tóxico y, a la vez, éste puede tener un efecto letal para algunos microorganismos, o bien, el tóxico puede no producir efectos observables en muchos otros. En definitiva, todo ello contribuirá a que se altere la comunidad del ecosistema. Además, la presencia de compuestos tóxicos, también, puede producir efectos subletales, como los cambios en el comportamiento o el estrés fisiológico.

ii) Efectos indirectos, derivados de la alteración de las especies y de la comunidad de los ecosistemas, ya sea por el aumento o el descenso de la abundancia de organismos, causado por los cambios en los niveles de depredación, la alteración de la cadena alimentaria de organismos superiores, la competencia entre especies, etc. (Flegger *et al.*, 2003).

En resumen, la presencia de contaminantes en el medio acuático constituye un reto adaptativo para los organismos. Las especies más sensibles estarán destinadas, irremediablemente, a la extinción y serán sustituidas por las más resistentes, lo que redundará en una alteración progresiva de los ecosistemas y de la comunidad acuática (Geist, 2011).

3.3. Problemas derivados del cambio global

Las comunidades ecológicas están en transformación constante, con la probabilidad de perfeccionarse; además, por lo que actualmente sabemos la casualidad y la historia desempeñan, también, un papel importante. En este sentido, los últimos conocimientos en biología evolutiva, ecología y paleontología reflejan que el *Homo sapiens* es una simple casualidad en la historia; sin embargo, es hoy la especie dominante en la Tierra. Por desgracia, nuestro impacto es devastador y, si seguimos destruyendo el entorno como hasta ahora, un número elevadísimo de las especies actuales del mundo se habrá extinguido a comienzos del próximo siglo. Aunque, como las demás especies que han existido, estamos también condenados a la extinción, pero tenemos el imperativo ético de proteger la diversidad de la naturaleza, no de destruirla (Leakey & Lewin, 2008).

Según la concepción darwiniana, el flujo de vida está orientado por una incesante lucha por la existencia en la que los más aptos dejan más descendientes y los menos aptos tienen menos posibilidades de reproducirse. Aunque el *Homo sapiens* haya llegado tarde al teatro evolutivo y en un momento en el que la diversidad de la vida del planeta estaba cerca de la cota más alta de su historia, lo cierto es que hemos llegado con la capacidad de devastar esa diversidad y romper el equilibrio. La razón y el conocimiento que aparecieron durante nuestra historia evolutiva dotó a nuestra especie de una flexibilidad de comportamiento que nos ha permitido multiplicarnos y crecer, con entera libertad, prácticamente en todos los ambientes de la Tierra, pero con ello estamos succionando nuestro sostén y reduciendo los dones de la naturaleza, mientras aumentan los nuestros.

Con este planteamiento, en este apartado se va a incidir en dos efectos importantes que son la causa de ese desequilibrio natural: la primera es el quebranto biológico que, con la introducción de especies foráneas, se produce en muchos ecosistemas y la segunda está relacionada con la destrucción de hábitats vírgenes debido las actividades desarrolladas en las poblaciones humanas.

3.3.1. Especies invasoras

En el contexto de cambio climático, las especies invasoras han recibido por el momento poca consideración. Actualmente es una realidad que el cambio climático está alterando la estructura y composición de las comunidades y, como consecuencia, el funcionamiento de los ecosistemas, actuando éste como una fuerza impulsora que, sin duda, aumentará el riesgo de invasiones biológicas (Capdevila-Argüelles *et al.*, 2011). Además de los efectos en los ecosistemas, la invasión de especies puede tener efectos drásticos en la economía mundial. Según un informe científico publicado en Nagoya (Japón) en la X Conferencia sobre Biodiversidad (2010), el cambio climático y las especies invasoras constituyen un “dúo mortal” cuyos efectos, tenidos en cuenta conjuntamente, podrían provocar la pérdida del 10 % del Producto Interior Bruto de los países.

Las especies invasoras constituyen una de las principales amenazas para la biodiversidad, ya que son uno de los factores que están contribuyendo, en mayor medida, a la rápida y masiva pérdida de otras especies en las últimas décadas.

Los principales mecanismos de introducción de especies en el medio marino son: 1) por el movimiento de especies adosadas al casco de los barcos y retenidas en la película de bioensuciamiento (*biofouling*) de los mismos (Drake & Lodge, 2007), 2) al ser transportados en el agua de lastre de las embarcaciones y 3) en el establecimiento de zonas de acuicultura y pesquerías y la construcción de canales (Ruiz *et al.*, 1997).

3.3.2. Floraciones masivas de microalgas tóxicas (HABs)

El término *Harmful Algal Blooms* (HABs) o *Floraciones de Algas Nocivas* fue adoptado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO en 1992 para denominar cualquier proliferación de microalgas (independientemente de su concentración) percibida como un daño por su impacto negativo en la salud pública, la acuicultura, el medio ambiente y las actividades recreativas (Reguera *et al.*, 2011). Entre los efectos más negativos de los HABs se encuentran las intoxicaciones de personas y animales por consumo de productos marinos (moluscos o peces) contaminados con las toxinas generadas por ciertas especies de fitoplancton tóxico, como dinoflagelados o diatomeas (Hallegraeff, 1993). Por otro lado, también es importante destacar que las floraciones de cianobacterias son las principales causantes de contaminación por ficotoxinas en los suministros de agua potable y de abastecimiento de agua, además de comunicar al agua sabores y olores muy desagradables y, también, formar espesas natas de aspecto repulsivo (Carmichael, 1994, Carpenter & Carmichael, 1995, Mur *et al.*, 1999). Asimismo, los *blooms* incontrolados de cianobacterias tóxicas son responsables de grandes mortalidades en masa de animales salvajes, muchos protegidos y de gran valor ecológico (López Rodas *et al.*, 2008a). En la figura 3.6. se muestran dos imágenes de sendas floraciones masivas de dinoflagelados tóxicos y cianobacterias.

a)



b)



Figura 3.6. Imágenes de Floraciones de Algas Nocivas: a) dinoflagelados tóxicos en medio marino (Calvo-Vargas & Arguedas, 2012) b) cianobacterias tóxicas en aguas continentales (<http://www.bessl.es/>).

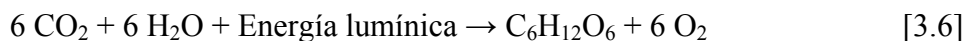
En los últimos años, estos fenómenos han cobrado una connotación alarmante a nivel mundial, debido al aparente incremento de la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de estos episodios dando lugar, como resultado adverso, a graves impactos en la salud pública y en la economía (Hallegraeff, 1993). Este incremento ha sido principalmente atribuido a los fenómenos de eutrofización (Camargo & Alonso, 2006) o

a la introducción de especies invasoras (Lilly *et al.*, 2002), incrementando la posibilidad de que estos nuevos episodios de HABs estén vinculados directamente con el cambio climático (Davidson *et al.*, 2012).

3.4. Importancia ecológica del fitoplancton

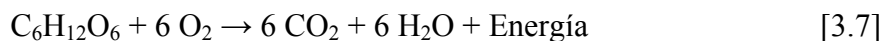
El fitoplancton está constituido por un conjunto de organismos autótrofos con capacidad fotosintética, por lo que fundamentalmente viven dispersos en la capa más superficial de los ecosistemas acuáticos, dada la necesaria presencia de luz en su supervivencia. Las microalgas (principales componentes del fitoplancton) son los más relevantes productores primarios y constituyen la base de las redes tróficas marinas (Simon *et al.*, 2009; Winder & Sommer, 2012). Cabe resaltar que, aunque una gran parte de los organismos fotosintetizadores del planeta son las plantas terrestres, los océanos ocupan cerca del 75 % de la superficie de la Tierra y reciben una mayor proporción de la radiación lumínica del sol, por lo que un alto porcentaje del correcto funcionamiento del planeta se debe a la “salud” de los organismos marinos fotosintéticos que, en su mayoría, se trata de organismos fitoplanctónicos microscópicos, verdaderos responsables del balance de carbono en la Tierra y, por consiguiente, fuertemente dependientes de las alteraciones provocadas por el cambio climático (Forest *et al.*, 2011).

Los productores primarios se encargan de fijar la energía en los ecosistemas, siendo la producción primaria el punto de partida para la circulación de energía y nutrientes a través de las cadenas tróficas. Mediante la fotosíntesis, el fitoplancton sintetiza materia orgánica a partir de la energía lumínica del sol (reacción [3.6]), denominándose producción primaria bruta la cantidad de energía fijada en el proceso en forma de biomoléculas. La producción primaria neta es la energía fijada en la fotosíntesis menos la energía utilizada en la respiración, es decir la producción primaria bruta menos la de la respiración y es importante mencionar que gran parte del mantenimiento del equilibrio del planeta está relacionado con el balance energético asociado a tales procesos básicos: fotosíntesis y respiración.



La energía lumínica en forma de fotones es captada por los pigmentos fotosintetizadores, generándose un flujo o cadena de electrones que desprende energía, siendo dicha energía la empleada para la síntesis de ATP y de NADPH. A esta fase se la denomina fase lumínica o etapa fotodependiente. En una segunda fase denominada fase oscura, etapa fotoindependiente o ciclo de Calvin, la energía química contenida en el ATP y en el NADPH es utilizada para reducir moléculas de CO₂ hasta gliceraldehído, a partir del cual se sintetizan las distintas moléculas orgánicas, principalmente glucosa, y a partir de ésta el resto de carbohidratos. De esta forma, el proceso fotosintético representa un punto crítico de gran importancia dentro de los ciclos naturales del carbono y del oxígeno y, en general, dentro de la trama de los ciclos biogeoquímicos. Pudiéndose considerar a la fotosíntesis realizada por el fitoplancton como una “bomba biológica de carbono” que ayuda a mitigar el efecto invernadero, transportando el carbono desde la atmósfera hacia las aguas profundas y sedimentos oceánicos (Pennington *et al.*, 2006).

Además, el fitoplancton es la base de la cadena trófica y, por tanto, supone el alimento de muchos seres vivos; son los únicos organismos capaces de crear materia orgánica a partir de materia mineral y radiación solar. La materia orgánica así generada estará disponible para ser consumida por el resto de especies del planeta y, de ella, a su vez, obtener la energía que necesitan, mediante un sencillo proceso de oxidación resumido en la reacción [3.7]. La energía desprendida en dicha reacción queda almacenada como ATP y NADH y disponible para que los organismos la utilicen en cualquier proceso en el que se necesite energía.



3.4.1. Los ecosistemas acuáticos

Océano

El océano ocupa la mayor parte de la superficie terrestre, por lo que, también, recibe mayoritariamente la energía proveniente del sol. El agua absorbe y dispersa la luz, por lo que la calidad e intensidad de la energía lumínica disminuye con la

profundidad. A pesar de que el fitoplancton solo es capaz de utilizar la energía solar en los primeros metros, lo que se conoce como *zona fótica*, es el responsable de la entrada de la energía solar a los ecosistemas marinos y la base de su mantenimiento, por ser el encargado de producir la materia orgánica a expensas del dióxido de carbono y los nutrientes esenciales, tales como nitratos y fosfatos, que siempre se encuentran en el agua del mar; posteriormente, la materia orgánica será aprovechada por otros organismos.

Finalmente, a medida que muere el fitoplancton o los organismos que se alimentan de él, las bacterias metabolizan los restos y van regenerando la sustancia inorgánica, CO_2 y los nutrientes básicos, con los que el fitoplancton iniciará nuevamente el ciclo de la fotosíntesis (figura 3.7.); no obstante, también parte del CO_2 regenerado puede regresar a la atmósfera (Cifuentes *et al.*, 1997). Sin embargo, debido al fenómeno de la gravedad, muchos de esos nutrientes y materia orgánica se hunden y, por consiguiente, ya no están disponibles en el estrato fótico para ser nuevamente utilizados; esto representa una pérdida neta de materia orgánica y de nutrientes.

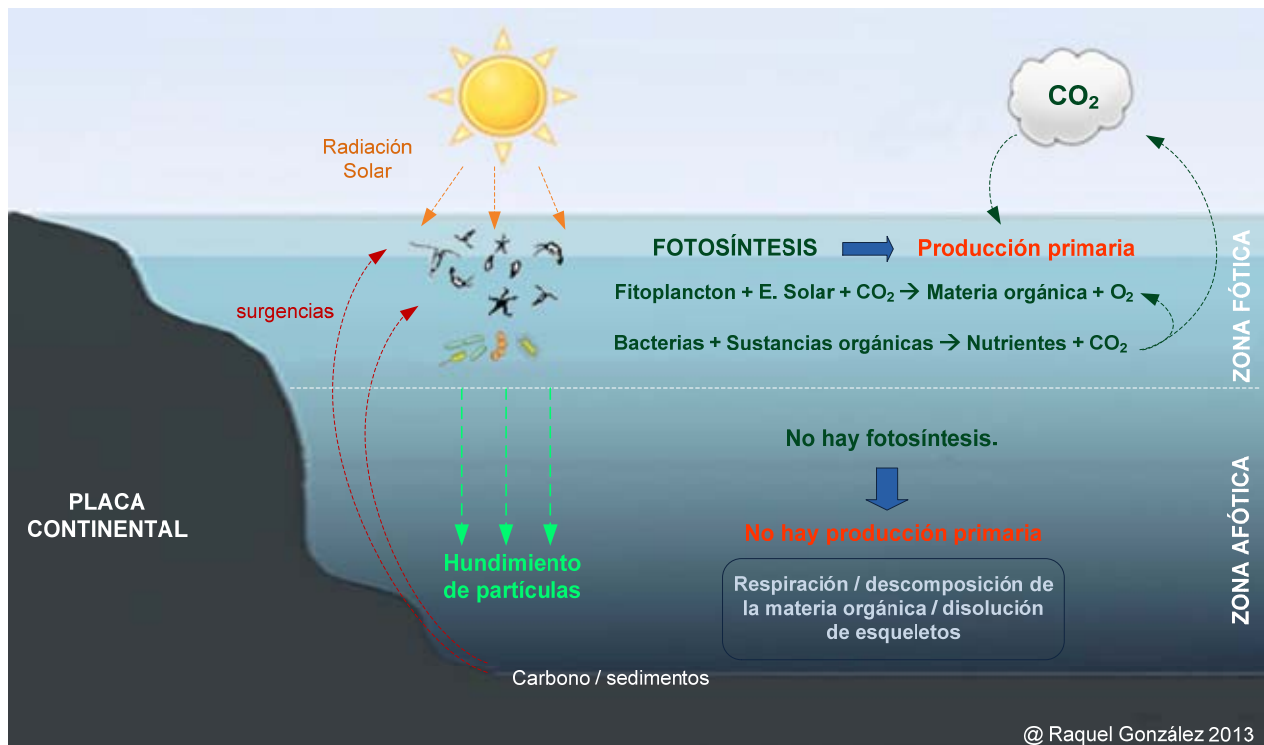


Figura 3.7. Actividad del fitoplancton en la superficie y en las zonas profundas del océano.

No obstante, el océano dispone de fuerzas hidrodinámicas y meteorológicas, conocidas como movimientos de surgencia, que permiten devolver esos nutrientes a la superficie; los lugares donde éstos son favorables son, en general, zonas muy ricas en vida marina. Sin embargo, existen otras zonas donde estos movimientos ascendentes de masas de agua oceánica, que devuelven los nutrientes a zonas menos profundas, no son tan favorables, esto provoca que se trate de zonas en donde la superficie marina está bastante limitada en cuanto a la disponibilidad de tales nutrientes; dichas zonas se conocen como desiertos biológicos y, en ellas, la producción primaria es mucho menor. Por este motivo, en los océanos, donde los movimientos de surgencia no son tan acusados como en las zonas costeras, no se llega al 30 % de la producción primaria total del planeta a pesar de su gran extensión (Pennington *et al.*, 2006), debido, fundamentalmente, a que en su superficie hay luz pero no nutrientes y, por el contrario, en el fondo hay nutrientes pero no llega la luz.

Este fenómeno justifica, por ejemplo, que en los mares tropicales sean poco productivos. Esto es debido a que la radiación solar calienta de forma importante las aguas más superficiales pero no tanto las aguas más profundas, por lo que se establecen zonas de diferente temperatura formando la llamada estratificación térmica, la cual hace menos favorables los movimientos de surgencia. Este hecho también explica que los mares tropicales sean de un color azul intenso, lo que no es más que una clara manifestación de la falta de vida planctónica y de materia orgánica en general. Estos fenómenos también justifican que la productividad primaria de otras regiones oceánicas, como las menos templadas y las polares, sea superior a la que se da en los mares tropicales, casi siempre pobres en nutrientes (Cifuentes *et al.*, 1997).

Zonas costeras

Las zonas cercanas a los continentes presentan importantes surgencias y se caracterizan por un mayor movimiento de las aguas debido a la acción del oleaje, las mareas y las corrientes, los cuales les permiten contar con una elevada disponibilidad de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo; además, la poca profundidad ayuda a disponer de una mayor captación lumínica. Todo ello, junto a los numerosos aportes de energía provenientes de los ríos y las lluvias, hace que en estas zonas se propicie,

significativamente, la actividad de los diversos grupos de productores primarios y secundarios, en contraste con la región oceánica donde la producción primaria se debe principalmente al fitoplancton. Todo ello avala el hecho de que las zonas costeras reúnan las características necesarias para convertirse en unas de las más productivas del planeta (Varona-Cordero & Mendieta, 2003).

Debido a la elevada concentración biológica localizada en las áreas del mar cercanas a los continentes, no debe extrañar que las principales pesquerías del mundo estén concentradas en las zonas correspondientes a las plataformas continentales. La experiencia ha demostrado que son los lugares donde los peces se encuentran con mayor frecuencia debido a la abundancia de alimento.

En definitiva, a pesar de que las zonas próximas a las costas solo ocupan el 12 % de la superficie marina, estas regiones costeras son cien veces más productivas, por unidad de superficie que el mar abierto y, por tanto, tienen un lugar predominante entre las regiones que más producen en el planeta (Costas & López Rodas, 2011)

Aguas continentales

El 97,4 % el agua del planeta se encuentra en los océanos y sólo el 2,6 % es agua dulce. A su vez, menos de la tercera parte de esta última corresponde a aguas superficiales tales como ríos, lagos, embalses, charcas etc., siendo el agua de las otras dos terceras partes la que corresponde a aguas subterráneas y glaciares. Así pues, aunque las aguas continentales no alcancen el 1 % de la superficie del planeta (Dajoz, 2002) representan una gran contribución a la producción primaria, a pesar de su reducida extensión. La razón de todo ello radica en que en su seno conviven una gran variedad de diferentes especímenes, destacando grandes comunidades de organismos fitoplanctónicos, muchos de ellos extremadamente productivos (Costas & López Rodas, 2011).

3.4.2. Diferentes grupos ecológicos del fitoplancton

El *plancton* es el conjunto de microorganismos, tanto vegetales como animales, adultos y larvarios, que viven flotando en las aguas o están dotados de escasos elementos de locomoción. Ese término fue utilizado por primera vez por Víctor Hensen en el año de 1887, y significa "errante" o "vagabundo". Asimismo, los seres que forman el plancton son aquellos que se caracterizan por su independencia biológica. El conjunto de organismos acuáticos autótrofos con capacidad fotosintética ha sido designado por los científicos como *fitoplancton*, para distinguirlos de la fracción del plancton constituida por seres que se alimentan, por ingestión, de materia orgánica ya elaborada; a estos últimos se les llama *zooplancton*.

Así, el fitoplancton es un grupo de organismos que se caracteriza principalmente por hacer la fotosíntesis, pero también por su abundancia y diversidad. Está constituido por especies con características muy diferentes y, para poder entender el contexto de la importancia ecológica que representan, se ha realizado una división claramente diferenciada en cuatro grupos ecológicos basada en la distribución y el hábitat:

- **Fitoplancton oceánico:** Constituido principalmente por microalgas eucariotas de tipo haptofita y organismos procariotas como proclorofitas y cianobacterias. Destacar el grupo de los cocolitofóridos que, al poseer una cubierta celular formada de carbonato cálcico, dependen íntimamente del correcto funcionamiento del ciclo de carbono.

- **Fitoplancton endosimbionte de los corales:** Caso especial de dinoflagelados que viven en simbiosis con los corales "zooxantelas". Estas zonas al movilizar ingentes cantidades de carbonato cálcico son fundamentales para el secuestro de CO₂ de la atmósfera.

- **Fitoplancton costero:** Grupo extremadamente diverso que abarca muchos géneros, entre las que destacan diatomeas, clorofíceas, dinoflagelados, etc. Al vivir en zonas caracterizadas por una alta cantidad de nutrientes pueden llegar a proliferar excesivamente formando los *blooms* de microalgas.

- **Fitoplancton aguas continentales:** Comunidad de organismos con gran riqueza, donde abundan, sobre todo, las clorofíceas, cianobacterias y las diatomeas.

En la figura 3.8. puede observarse algunas imágenes de diversas especies de fitoplancton: agua marina (figura 3.8. a, b y c) y agua dulce (figura 3.8. d).

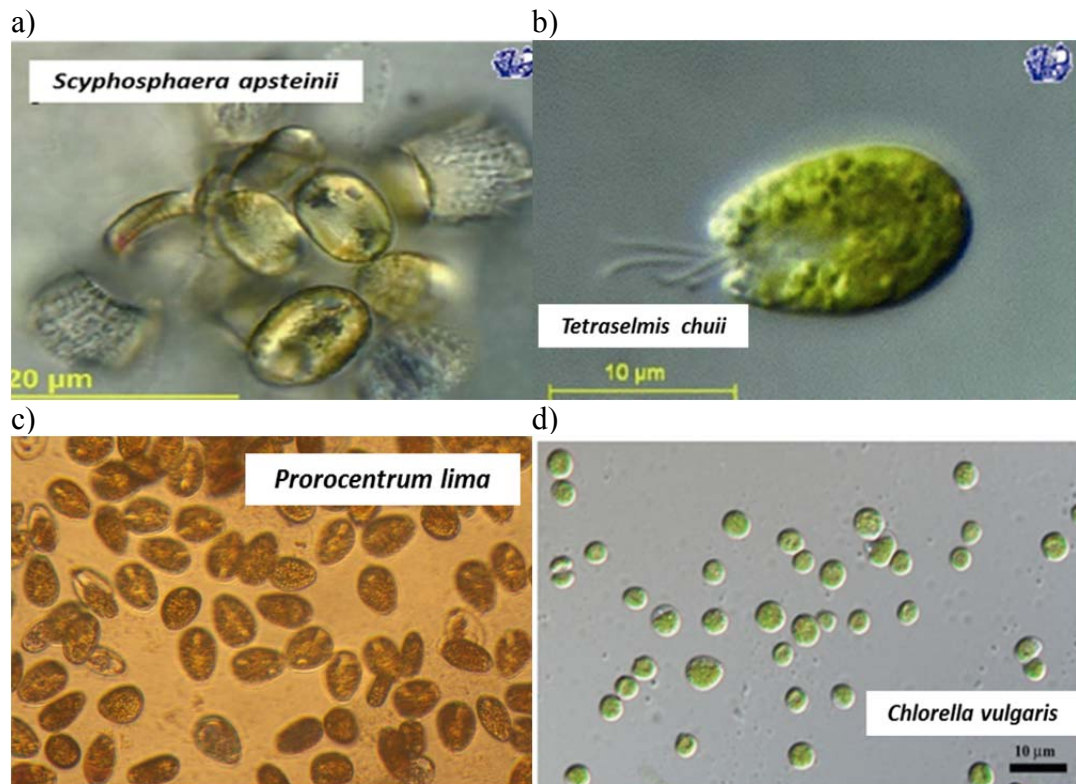


Figura 2.8. Imágenes de fitoplancton: a) *Chlorella vulgaris* (Held & Raymond, 2011), b) *Tetraselmis chuii* (Simon et al., 2009), c) *Prorocentrum lima*, d) *Scyphosphaera apsteinii* (Simon et al., 2009).

3.5. Estrategias adaptativas y origen de la adaptación en el fitoplancton

La historia de la Tierra ha estado marcada por grandes episodios de extinciones masivas. Los fósiles revelan que muchas especies se perdieron, sin embargo, a pesar de las catástrofes cósmicas acaecidas, hoy en día los organismos fitoplanctónicos continúan existiendo aunque, también es cierto, que solo después de haber pasado por largas épocas de gran estrés medioambiental. Así, se han encontrado estromatolitos fosilizados de cianobacterias de, por lo menos, hace 2.800 Ma y supervivientes de estos periodos. Esta circunstancia hace pensar que, sin duda, muchos organismos

fitoplanctónicos serán capaces, también, de sobrevivir al cambio global que se está produciendo actualmente.

Sin embargo, todavía quedan muchas preguntas y cuestiones que permanecen sin responder, ejemplos de algunas de ellas son:

- ¿Cómo han conseguido sobrevivir y proliferar los microorganismos bajo tales condiciones de estrés? ¿Disminuirá la biomasa algal en el futuro? ¿Qué grupos fitoplanctónicos saldrán beneficiados por los cambios medioambientales?
- ¿Cuáles son las fuerzas de la evolución que les han llevado a tener las características genotípicas y fenotípicas actuales?
- ¿Existe un límite para la adaptación, un máximo que una vez superado, irremediablemente conduzca a la extinción?

Por lo tanto, predecir cómo las comunidades de fitoplancton se reorganizarán en el futuro en respuesta a los cambios en el clima y a otros factores estresantes es uno de los mayores desafíos para los oceanógrafos, ecologistas y científicos medioambientales. Se hacen, por tanto, imprescindibles estudios que aporten algo de luz ante estas incertidumbres, que permitan avanzar en el conocimiento de la capacidad de adaptación y evolución de las especies de fitoplancton y que ayuden a vislumbrar las posibilidades de reacción de los organismos ante los cambios ambientales que se están produciendo en el planeta, los cuales, sin duda, se agudizarán en un futuro no muy lejano.

Existen amplios trabajos de evolución experimental que han analizado bacterias, insectos, plantas terrestres y otros organismos (Elena & Lenski, 2003; Garland & Rose, 2009); sin embargo, los estudios experimentales sobre la evolución del fitoplancton apenas están comenzando (Litchman *et al.*, 2012; Reusch & Boyd, 2013). En este sentido, el trabajo que se resume en este documento de tesis trata abordar este reto y de contribuir al conocimiento de los mecanismos y capacidades de adaptación de este tipo de microorganismos y que, actualmente, pero no se sabe por cuánto tiempo más, están manteniendo un equilibrio tenso en el planeta.

3.5.1. Fuerzas implicadas en la evolución

La evolución, como propiedad inherente de los seres vivos, ha sido un tópico ampliamente debatido por la comunidad científica a lo largo de los años y se puede definir como el conjunto de los cambios a través del tiempo que han derivado en la gran diversidad de organismos que existen sobre la tierra, habiéndose reunido una serie de evidencias que demuestran que todos los organismos vivos descienden de un ancestro común (Penny & Poole, 1999; Kutschera & Niklas, 2004) y que las especies actuales son el resultado de una serie correlativa de eventos de especiación y extinción (Bapteste & Walsh, 2005).

Son muchos los científicos que desde la antigüedad han aportado diversas teorías sobre el proceso evolutivo, pero no fue sino hasta la publicación de “El origen de las especies” de Charles Darwin en 1859 (Darwin, 1859) cuando el hecho de la evolución comenzó a ser ampliamente aceptado. Esta obra revela que la selección natural es el principal motor del cambio evolutivo, entendiendo como selección natural la reproducción diferencial de los genotipos más aptos en el seno de una población biológica. Sin embargo, a lo largo de la historia otros autores han postulado que, además de la selección natural, existen otros mecanismos implicados en el proceso de evolución.

De este modo, a mediados de la década de los años 70, Motoo Kimura formuló la “Teoría neutralista de la evolución molecular”, estableciendo de manera firme la importancia de la deriva génica como mecanismo de evolución (Kimura, 1983); entendiendo por deriva genética, el efecto estocástico consecuencia del muestreo aleatorio en la reproducción y la pérdida de alelos por azar y no por selección natural. Se trataría de un cambio aleatorio en la frecuencia de alelos de una generación a otra, que se concretaría en una pérdida de los alelos menos frecuentes y una fijación de los más frecuentes, resultando una disminución en la diversidad genética de la población. Adicionalmente, en la misma época Gould y Lewontin (Gould & Lewontin, 1979) introdujeron el término de la contingencia histórica para explicar el porqué de la supervivencia de unas especies y no de otras. Posteriormente Gould (Gould, 1989) postuló que el mundo actual ha sido el resultado de una multitud de mundos posibles,

no pudiéndose predecir el resultado de entrada, defendiendo que la evolución es una historia contingente, donde el azar y las casualidades deciden de qué manera se desplegarán las formas vivas en nuestro planeta. Así aunque en la moderna teoría sintética de la evolución, la selección natural como reproducción diferencial de los genotipos en una población sigue teniendo el papel más destacado, ya no es solo ella la única reconocida como causa de evolución.

A pesar de que, ya más recientemente, el peso de las distintas fuerzas evolutivas en el proceso de adaptación ha sido ampliamente discutido (Hall & Hallgrímsson, 2008), existen escasas pruebas empíricas que aporten datos de las implicaciones de la selección natural, el azar y la historia en el largo camino de la evolución. En este sentido, Stephan Jay Gould en 1989, propuso un experimento teórico, que se resume en “reproducir la cinta de la vida”; dicho experimento consistía en probar la repetitividad de la evolución desde cero, con el fin de esclarecer los efectos de la adaptación, el azar y la historia en la evolución y, además, demostrar los procesos implicados en los grandes eventos macroevolutivos (Gould, 1989).

Por supuesto que es imposible realizar el experimento visionado por Gould a gran escala, pero sí se pueden realizar trabajos experimentales rigurosos de corta duración y a pequeña escala, aplicando sus consideraciones teóricas en un experimento magistral de microevolución. Esta idea fue desarrollada por Travisano y colaboradores en 1995 (Travisano *et al.*, 1995) con una experimentación diferente; según la cual, en vez de reproducir la cinta de la vida secuencialmente, se puede conseguir el mismo objetivo realizando un experimento donde muchos replicados independientes de una misma población se reproducen simultáneamente y se compara la evolución de un carácter específico entre las poblaciones ancestrales y las derivadas, cuando se somete a los distintos replicados a una presión selectiva a largo plazo. Por consiguiente, la variabilidad que se produzca entre las medias de cada valor considerado en la población ancestral y la población derivada explicará la contribución de cada una de las fuerzas evolutivas en dicho cambio. Precisamente este experimento diseñado por Travisano y colaboradores ha sido el utilizado en la presente tesis para estudiar los distintos componentes del proceso evolutivo.

3.5.2. Adaptación de los microorganismos fitoplanctónicos

Una de las consecuencias de la evolución es la adaptación, gracias a la cual una determinada especie se adecúa mejor a su hábitat y, como consecuencia de ello, tanto la estructura como el funcionamiento de un organismo lo hacen más adecuado para sobrevivir en un entorno específico. En este escenario de cambio global debido, principalmente, a la presión antropogénica sobre los ecosistemas, los organismos se ven en la necesidad de adaptarse al cambio constante de su hábitat natural. Gracias a tres mecanismos diferentes los organismos pueden sobrevivir en condiciones “estresantes”, dentro de unos límites. En primer lugar, la plasticidad fenotípica es la que determina la supervivencia (Charmantier *et al.*, 2008) gracias a un fenómeno denominado aclimatación o adaptación fisiológica, ya que, en un determinado rango de variación ambiental, los organismos pueden modificar su expresión genética para adaptarse a las nuevas circunstancias (Bradshaw & Harwick, 1989; Belfiore & Anderson, 2001). Así, las especies con mayores rangos de plasticidad fenotípica tienen, por lo general, un mayor número de posibilidades de sobrevivir al cambio global (Nicotra *et al.*, 2010).

En un segundo nivel, una vez superados los niveles de plasticidad fenotípica se producirán cambios en la composición de las especies; según los cuales las especies mejor adaptadas a las nuevas condiciones incrementarán su abundancia desplazando a las más pobremente adaptadas (Ackerly, 2003; Urban *et al.*, 2012). Finalmente, cuando las condiciones ambientales superan los límites de la adaptación fisiológica, la supervivencia depende exclusivamente de la adaptación genética mediante la selección de nuevos genotipos que confieran resistencia través de la mutación, la transferencia horizontal de genes o recombinación (Sniegowski & Lenski 1995; Sniegowski 2005; Litchman *et al.*, 2012).

Para que existan unos organismos mejor adaptados al medio ambiente que les rodea y con mayores probabilidades de sobrevivir, tiene que existir variabilidad entre los individuos pertenecientes a la misma especie. En las poblaciones naturales de seres vivos la variabilidad surge por mutaciones en el material genético, migraciones entre poblaciones (flujo genético) y por la reorganización de los genes a través de la reproducción sexual. Sin embargo, los microorganismos en general, y los

microorganismos fitoplanctónicos en particular, tienen poblaciones naturales con características biológicas tan especiales que deberían puntualizarse: se caracterizan por sus grandes tamaños de población, requerir tiempos de generación muy cortos y, en la mayoría de los casos, ser haploides y predominar en ellos la reproducción asexual (Lynch *et al.*, 1991). En microorganismos con reproducción asexual, las mutaciones son la única fuente de variabilidad genética y se consideran el principal motor de la evolución. Teóricamente, todas las características de un organismo determinado pueden cambiar por mutación, pero solo algunas de ellas proporcionan cierta ventaja en la carrera de la selección. Por ejemplo, esta ventaja puede suponer crecer más rápido que el genotipo salvaje, desplazando a éste del nicho ecológico cuando se aplica una presión de selección.

Las mutaciones son cambios en el material genético (ADN), siendo importante recalcar que pueden modificar el fenotipo original del microorganismo (Madigan *et al.*, 2004). La evolución resultaría de la acción selectiva del medio ambiente sobre estos organismos mutantes favoreciendo la supervivencia y reproducción de los mejor adaptados. Es una afirmación generalizada entre los genetistas que las mutaciones ocurren de manera natural durante la replicación del ADN, independientemente de las condiciones ambientales, siendo el proceso de selección el que impondrá la dirección de la adaptación. Ya en las décadas de los años 40 y 50 del siglo pasado, diversos experimentos demostraron, por diferentes métodos y de forma indiscutible, que las mutaciones ocurren en las bacterias independientemente del medio selectivo (Luria & Delbrück, 1943; Lederberg & Lederberg, 1952). Sin embargo, años más tarde surgió la polémica, Cairns desarrolló un experimento en el que observaba la posibilidad de que las mutaciones podían ser inducidas por el medio y las denominó mutaciones dirigidas (Cairns *et al.*, 1988).

Desde el punto de vista evolutivo, se han formado dos corrientes preferentemente decantadas a favor de una y de otra teoría. El punto de vista neo-Darwinista está a favor de la teoría de que los organismos se adaptan a nuevos ambientes gracias a la presencia de variantes genéticas pre-existentes en las poblaciones (Sniegowski & Lenski, 1995). En contraste, la visión Lamarckista está a favor de la teoría de que los microorganismos,

ante la presencia de un agente selectivo, podían dirigir las mutaciones para adaptarse a la nueva situación (Cairns *et al.*, 1988; Foster, 2000).

La clave para resolver el problema planteado es dilucidar entre ambas teorías aportando pruebas fehacientes que demuestren el origen preadaptativo o postadaptativo de las mutaciones. Sorprendentemente, en la comunidad científica no existen muchos estudios que relacionen directamente la aparición de mutantes con el proceso de adaptación (Sniegowski, 2005). La principal causa de esta falta de estudios puede ser debida a que es muy complicado medir las tasas de mutación específicas en organismos diploides, pluricelulares, con reproducción sexual que vivan en poblaciones bien definidas. Por el contrario, los microorganismos en general, y en particular las cianobacterias y las microalgas, poseen unas características especiales que les hace ser extraordinariamente apropiados para los estudios de evolución y mutación.

En este sentido, Costas y Lopez Rodas en el 2001 (Costas *et al.*, 2001) basándose en el magistral experimento planteado por Salvador E. Luria y Max Delbrück en 1943 (Luria & Delbrück, 1943) denominado “Análisis de Fluctuación”, diseñaron una modificación que permitía aplicar el procedimiento a cultivos líquidos y, además, dicho protocolo experimental ha servido durante los últimos años como una extraordinaria herramienta para conocer la naturaleza de las mutaciones (Costas *et al.*, 2007, 2008; López-Rodas *et al.*, 2001, 2007, 2008b, 2008c; González *et al.*, 2012). Otra forma de demostrar la naturaleza de la mutación, de una manera más gráfica y menos cuantitativa, es aplicar el experimento diseñado por Howard B. Newcombe en 1949 (Newcombe, 1949). Son, precisamente, ambos protocolos experimentales los que se han empleado en el desarrollo del presente trabajo.

3.5.3. Límites de la adaptación de los microorganismos fitoplanctónicos

Los organismos fitoplanctónicos para adaptarse al medio ambiente que les rodea pueden experimentar mutaciones beneficiosas que les proporcionan ventajas en la carrera de la selección. Si existe una presión selectiva constante en un ambiente concreto, los organismos con la mutación beneficiosa al reproducirse asexualmente transmitirán la mutación a la descendencia y la población sobrevivirá. Sin embargo, las

presiones de selección en el medio ambiente provocadas por factores antropogénicos rara vez se mantienen de forma constante y la tendencia es que aumente la presión de selección en el futuro próximo. Por lo que resulta tremendamente interesante averiguar cuál es la presión selectiva máxima que los organismos fitoplanctónicos pueden soportar en un medio ambiente contaminado; siendo fundamental esta idea cuando se pretende enfocar la situación al deterioro progresivo que está sufriendo el planeta y que parece que, por ahora, no tiene límites.

Además, otro aspecto muy importante es el estudio de la capacidad diferencial de las distintas especies de fitoplancton ante las presiones ambientales derivadas del cambio global. Así, despendiendo de las características intrínsecas de los grupos fitoplanctónicos implicados y de su capacidad de adaptación podemos decir que existirán especies “ganadoras” y “perdedoras”, y que existirán cambios locales de composición y abundancia en las floraciones algales.



4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

El cambio global antropogénico está alterando irremediablemente todos los procesos de la biosfera. Como consecuencia de ello, la supervivencia de los organismos fitoplanctónicos se está viendo afectada de manera negativa, lo que supone que estén encontrándose ante una gran presión de selección. La gran importancia del fitoplancton radica en que los microorganismos que lo componen son los principales productores primarios y, por tanto, la base de la cadena alimentaria en los ecosistemas acuáticos; por este motivo, su capacidad de adaptación al cambio global será la pieza clave para entender las repercusiones y las consecuencias que, en el futuro inmediato, vayan a derivarse en el planeta.

Las principales cuestiones que se plantean ante el gran desafío del cambio global podrían plasmarse del modo siguiente:

- **¿Cuál es la contribución de cada una de las fuerzas evolutivas implicadas en el proceso?**
- **¿Cuál es el principal mecanismo de adaptación del fitoplancton ante los cambios ambientales bruscos?**
- **¿Cuál es la máxima capacidad de adaptación que puede soportar el fitoplancton? ¿Existen diferencias en las poblaciones?**

Con este planteamiento, la labor experimental presentada en esta memoria se ha diseñado con la intención de contribuir a dar respuesta a los anteriores interrogantes, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo 1

Dilucidar el peso o importancia de las distintas fuerzas evolutivas (adaptación, azar y contingencia histórica) implicadas en la adaptación del fitoplancton al cambio global. Concretamente, se ha investigado la evolución del fitoplancton frente al aumento de la temperatura y a la acidificación de los océanos.

Objetivo 2

Determinar el origen de la adaptación del fitoplanctón a los cambios ambientales, diferenciando entre si ésta es de tipo fisiológico o, por el contrario, es fundamentalmente genética. Así, se ha analizado la respuesta del fitoplancton frente a contaminantes químicos de naturaleza orgánica e inorgánica y, también, al aumento de la temperatura.

Objetivo 3

Establecer la máxima capacidad de adaptación de los organismos fitoplanctónicos al cambio global. Concretamente, se ha analizado su respuesta al aumento de la contaminación por cobre en los ecosistemas acuáticos y al calentamiento global. Además, también se pretendió averiguar si dicha máxima capacidad de adaptación es diferencial entre grupos taxónomicos y ecológicos.

Objetivos complementarios

Adicionalmente a la realización de la labor de investigación anterior, se ha contemplado el hecho de abordar los siguientes retos experimentales:

- Determinar si el fitoplancton resistente introducido en un nuevo ecosistema puede llegar a ser considerado una especie invasora.
- Valorar la posibilidad de utilizar fitoplancton resistente a determinados compuestos tóxicos en procesos de tipo biotecnológico como las técnicas de biorremediación.



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Microalgas empleadas en los experimentos

Las microalgas son microorganismos muy apropiados para los estudios de evolución debido a que tienen un tiempo de generación muy corto y, además, sus cultivos se caracterizan por tener grandes poblaciones que pueden ser manipuladas durante muchas generaciones. Se ha de indicar, además, que se trata de microorganismos que se reproducen asexualmente, lo que implica que se pueden obtener replicados idénticos caracterizados por tener un único genotipo, por lo que su única fuente de variabilidad genética es la mutación. Todas las microalgas empleadas en los experimentos pertenecen a la colección de cultivos fitoplanctónicos del Departamento de Producción Animal (Genética) de la Facultad de Veterinaria de la UCM, exceptuando a una de ellas; ésta última fue, concretamente, la especie de *Symbiodinium* que pertenece a la colección del Australian Institute of Marine Science (AIMS) en Townsville, Australia.

5.1.1. Fitoplancton de agua dulce

- *Dictyosphaerium chlorelloides*

Dictyosphaerium chlorelloides (Nauman) Komárek & Perman, microorganismo aislado a partir de muestras tomadas de una laguna prístina en Sierra Nevada (España), perteneciente al género de algas verdes unicelulares, Phylum Chlorophycophyta, Familia Chlorellaceae. Su forma es esférica, mide de 2 a 10 µm; asimismo, puede encontrarse libre o formando colonias. *D. chlorelloides* ha sido considerado como un organismo particularmente útil en el campo de la biotecnología debido a su posibilidad para obtener nuevas cepas resistentes a una amplia gama de agentes abióticos.

- *Scenedesmus intermedius*

Scenedesmus intermedius (Chodat) aislado de un nuevo embalse de abastecimiento en Melonares, Sevilla (España), perteneciente al género de algas verdes

unicelulares, Phylum Chlorophycophyta, Familia Scenedesmaceae. Forma colonias de 2 a 4 células alineadas, ocasionalmente éstas pueden estar compuestas de 8, 16 o 32 células y, muy raramente, se desarrolla de forma unicelular. Las células, generalmente, tienen forma cilíndrica pero también pueden ser semilunares, ovoides o fusiformes. Normalmente, las células de los extremos tienen cada una dos espinas largas de hasta 200 μm de longitud que sobresalen de las esquinas exteriores.

- ***Microcystis aeruginosa***

Microcystis aeruginosa (Kützinger) Lemmerman, Phylum Cyanobacteria, Familia Microcystaceae. Sus células son esféricas, su tamaño va de 3 a 7 μm , forman colonias que se encuentran cubiertas con una envoltura mucilaginosa. Es la cianobacteria que, con mayor frecuencia, forma floraciones masivas de algas (“*Harmful Algal Blooms*”, HABs), habitualmente produce potentes toxinas siendo la más representativa la “microcistina”, lo cual suele causar grandes problemas medioambientales y económicos. Concretamente, en este trabajo se han utilizado tres cepas aisladas a partir de muestras tomadas en el Parque Nacional de Doñana, Huelva (España).

- ***Pseudoanabaena limnetica***

Pseudoanabaena limnetica (Lemmermann) Komarek, Phylum Cyanobacteria, Familia Pseudanabaenaceae cianobacteria aislada de una laguna prístina en el Parque Nacional de Doñana, Huelva (España). Sus células forman pequeños filamentos de alrededor de 5 μm de tamaño y, en ocasiones, también está implicada en la producción de floraciones masivas tóxicas, aunque es mucho menos frecuente su implicación en este tipo de fenómenos que *M. aeruginosa*.

5.1.2. Fitoplancton de agua marina

- ***Alexandrium minutum***

Alexandrium minutum (Halim) Phylum Dynophyta, Familia GoniDOMACEAE. Microorganismo aislado de la Ría de Vigo (España), se trata de un dinoflagelado caracterizado por su capacidad para desarrollar floraciones masivas perjudiciales para la

salud y la producción pesquera, comúnmente conocidas como “mareas rojas”. En la experimentación realizada para el desarrollo de este trabajo se han empleado dos cepas diferentes denominadas A11V y A12V, la primera de ellas caracterizada por su mayor toxicidad en relación con la segunda.

- ***Tetraselmis suecica***

Tetraselmis suecica (Kylin) Butcher Phylum Chlorophycophyta, Familia *Prasinophyceae*, aislado de la Bahía de Córcega (Italia). Las microalgas de esta especie son verdes y motiles, en lo que se refiere a su tamaño celular éste está comprendido entre 10 y 14 μm . Estos microorganismos son frecuentemente empleados en acuicultura debido a su alto contenido en lípidos.

- ***Navicula ramossisima***

Navicula ramossisima (Grunow) Cleve diatomea del Phylum Bacilliarophyta, Familia Naviculaceae, aislado del Golfo de Cádiz (España). Se trata de la diatomea más abundante en las aguas tanto dulces como marinas. Las diatomeas tienen una pared celular única compuesta por dos valvas separadas, cuyo componente principal es diverso material silicatado, denominado frústulo. Las diatomeas, en general, pueden tener morfología muy variada, en el caso concreto de *Navicula* sp. sus células se asemejan a forma de una “barca”.

- ***Prochloron* sp.**

Prochloron sp. Phylum Prochlorophyta, Familia Prochloraceae, aislado del Golfo de Cádiz (España). Se trata de microorganismos procariotas que realizan la fotosíntesis oxigénica cuyas células tienen morfología cocoide y son de muy pequeño tamaño oscilando entre 1 y 3 μm .

- ***Symbiodinium* Cepa C1**

Symbiodinium Cepa C1 Phylum Dinoflagellata, Familia Symbiodiniaceae aislado en el arrecife de coral de *Magnetic island*, Queensland (Australia), del orden scleractinia, especie *Acropora tenuis*. El género *Symbiodinium* abarca el grupo más grande y más frecuente de dinoflagelados endosimbiontes. Estas algas unicelulares residen habitualmente en el endodermo de cnidarios tropicales, como los corales, las anémonas de mar e incluso las medusas, donde transmiten los productos de la fotosíntesis al hospedador y, a su vez, éste recibe los nutrientes inorgánicos como por ejemplo CO_2 , NH_4^+ , etc.

5.2. Medios y condiciones de cultivo

A continuación se presenta la composición de los medios de crecimiento empleados así como, también, se hace una descripción de los protocolos y procedimientos seguidos para el cultivo de cada uno de los de los microorganismos empleados.

5.2.1. Medios de cultivo

- **Medio BG11**

En el caso del cultivo de cianobacterias y microalgas de agua dulce se utilizó el medio concentrado denominado BG11 (Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution) suministrado por Sigma-Aldrich. Como se trata de un medio concentrado, para obtener la solución definitiva de cultivo se añadían 20 mL de dicha solución por cada litro de agua destilada Milli-Q; posteriormente, se procedía al filtrado del preparado con un filtro Stericup (Stericup-VP Filter Unit, Merck Millipore) de $0,22\ \mu\text{m}$ para asegurar su esterilidad. El pH resultante del medio fue 6,5. La composición química de la disolución final por litro era la indicada en la tabla 5.I.

Tabla 5.I. Composición química del BG11.

Compuesto	Cantidad
NaNO ₃	1.5 g
K ₂ HPO ₄	0.04 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036 g
Ácido cítrico	0.006 g
Citrato amónico férrico	0.006 g
EDTA	0.001 g
NaCO ₃	0.02 g
Mezcla de trazas de metales	1.0 mL

A su vez, la composición de la disolución que incorporaba los metales traza se presenta en la tabla 5.II., la cual incluía las cantidades indicadas de cada una de las sales metálicas por cada litro de agua destilada Milli-Q.

Tabla 5.II. Composición de la solución de metales traza empleada en el medio BG11.

Solución de metales traza	
Compuesto	Cantidad
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222 g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.39 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	49.4 mg

- Medio F/2

Para el cultivo de microalgas marinas se empleó el medio F/2 (Guillards (F/2) Marine Enrichment Basal Salt Mixture, de Sigma Aldrich, añadiendo 20 mL de concentrado a 1 litro de agua de mar. Posteriormente, para asegurar la esterilidad de la

disolución así preparada, se procedía a la filtración de la misma haciéndola pasar a través de un filtro Stericup (Stericup-VP Filter Unit, Merck Millipore) de 0.22 μm . El pH resultante del medio fue de 7.34. La composición química por litro del preparado comercial es la indicada en la tabla 5.III.

Tabla 5.III. Composición del medio F/2.

Compuesto	Cantidad
NaNO_3	0.075 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.006 g
Na_2 EDTA	4.16 g
Mezcla de Vitaminas	1.0 mL
Mezcla de trazas de metales	1.0 mL

En el caso de este medio de cultivo, además del correspondiente aporte de metales traza, su composición final incluía, también, un suplemento vitamínico. Las respectivas composiciones de las disoluciones de ambos que incorporaba el preparado final se muestran en la tabla 5.IV.

Tabla 5.IV. Composición de la disolución de metales traza (a) y de la disolución de vitaminas (b) empleadas en la preparación del medio F/2.

a)

Solución de metales traza	
Compuesto	Cantidad
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.022 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.006 mg
Agua destilada	1.0 L

b)

Solución de Vitaminas	
Vitamina	Cantidad
Cianocobalamina (Vit B12)	0,01 g
Tiamina (Vit B1)	0,2 g
Biotina	0,01 g
Agua destilada	1.0 L

- Medio IMK

Para el cultivo de la cepa del género *Symbiodinium* se utilizó el medio Daigo's IMK desarrollado por el Instituto de Biotecnología Marina MBIC (Marine Biotechnology Institute Co., Ltd.) en Kamaishi, Japón, añadiendo 252 g del concentrado sólido a 1 litro de agua de mar. Posteriormente, para asegurar la esterilidad de la disolución así preparada, se procedía a la filtración de la misma haciéndola pasar a través de un filtro Stericup (Stericup-VP Filter Unit, Merck Millipore) de 0,22 μm . El pH resultante del medio fue de 7,22. La composición química por litro del preparado comercial es la indicada en la tabla 5.V.

Tabla 5.V. Composición del medio IMK.

Compuesto	Cantidad
NaNO_3	0.02 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0014 g
Na_2EDTA	0,037 g
K_2HPO_4	0,005 g
NH_4Cl	0,00268 g

Metales traza	
Compuesto	Cantidad
Fe-EDTA	5, 2 mg
Mn-EDTA	0,332 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.023 mg
$\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.014 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0073 mg
H_2SeO_3	0,0017 mg

Vitaminas	
Vitamina	Cantidad
Cianocobalamina (Vit B12)	0,0015 mg
Tiamina (Vit B1)	0,2 mg
Biotina	0,0015 mg

5.2.2. Condiciones de cultivo

Las distintas cepas de microalgas utilizadas en este estudio crecieron en cajas de cultivo estériles (Greiner, Bio-one Inc, Longwood, NJ, USA) provistas de un tapón especial que permite el intercambio gaseoso pero previene la contaminación por bacterias u hongos. En cada una de ellas se introducían 20 mL de medio de cultivo, BG11 o F/2 en cajas Greiner de 60 mL de capacidad, exceptuando el caso de *Symbiodinium* en el que se colocaban 300 mL de medio de cultivo IMK en cajas Greiner de 600 mL. Posteriormente, se inoculaban los microorganismos en dichos volúmenes de medio con unas gotas del cultivo original. Para el desarrollo de los cultivos, éstos se mantuvieron en una cámara climatizada (Ing.climas) a una temperatura constante de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, manteniendo un ciclo continuo de luz de 24 horas al día. La fuente de luz empleada para proporcionar energía lumínica a los cultivos fue generada por tubos fluorescentes de luz blanca (Philips 30W/33) a una intensidad de $80\text{ }\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR en la superficie de los recipientes de cultivo. En el caso concreto de la cepa del género *Symbiodinium* la intensidad a la que se cultivó fue de $60\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR, con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad a una temperatura constante de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El mantenimiento de los cultivos se ha llevado a cabo de tal manera que los microorganismos permanecieran siempre en la fase de crecimiento exponencial, para lo cual, antes de la llegada a la etapa de saturación del desarrollo del cultivo, se procedía a la transferencia seriada de una pequeña cantidad de inóculo en medio nuevo.

De forma previa al inicio de todos los experimentos evolutivos planteados en el plan de trabajo experimental presentado en este documento, cada una de las cepas era re-clonada para asegurar la homogeneidad genética. Dicha reclonación se realizaba inoculando una pequeña cantidad de células (de 10^2 a $3 \cdot 10^2$ células) en 20 mL de medio nutriente fresco para que, mediante reproducción asexual, se generara una línea clónica de células. De este modo, en los experimentos se evitaba la presencia de células mutantes preexistentes, surgidas al azar y de forma aleatoria, acumuladas en los propios cultivos de mantenimiento. Asimismo, siempre era necesario asegurarse que, de forma previa, el cultivo que se iba a emplear en los experimentos no tuviera ningún tipo de contaminación.

5.3. Procedimientos experimentales

5.3.1. Contaminantes

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto tóxico que pudieran tener una serie de contaminantes cuya presencia es relativamente frecuente en el medio ambiente. En este sentido, se han utilizado dos de naturaleza orgánica: hexaclorociclohexano o lindano y tributilestaño (TBT) y tres de naturaleza inorgánica: plomo, iridio y cobre. Todos ellos fueron aportados al medio de trabajo bajo la forma de presentación indicada en la tabla 5.VI, dichos compuestos tenían la calidad de reactivos de análisis.

Tabla 5.VI. Compuestos utilizados para la incorporación de contaminantes al medio.

Agente selectivo	Forma de presentación
Lindano	$C_6H_6Cl_6$
TBT	$C_{12}H_{28}Sn$
Plomo	$Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3H_2O$
Iridio	$Cl_6IrNa_2 \cdot 6H_2O$
Cobre	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$

5.3.2. Cálculo de la dosis-efecto de los cinco contaminantes utilizados

Con el fin de determinar el efecto tóxico que los contaminantes estudiados pueden ejercer sobre el genotipo salvaje de las distintas cepas de microalgas, se siguió el procedimiento detallado a continuación y resumido en la figura 5.1. En primer lugar, con este objetivo, se prepararon diferentes soluciones stock de los distintos tóxicos utilizados, empleando agua destilada como disolvente cuando se trataba de compuestos polares y etanol para los compuestos apolares. En el caso de utilizarse como solvente este último, era necesario que la solución stock previa fuera lo suficientemente concentrada con el objeto de no introducir más del 0,5 % de etanol en los cultivos experimentales. De acuerdo con este planteamiento las concentraciones de las diferentes soluciones de stock fueron de 150 ppm para las sales metálicas, de 100 ppm para el TBT y de 18.000, 6.000 y 2.000 ppm para el lindano. Por último, el agente selectivo en el caso del *Symbiodinium* fue la subida de temperatura.

Para cada caso, se colocaban tres cultivos control, en los que el fitoplacntón no iba a estar expuestos al tóxico, conteniendo 5 mL de medio fresco y un inóculo de $1 \cdot 10^5$ a $3 \cdot 10^5$ células/mL. Paralelamente, se dispusieron, también por triplicado, diferentes baterías de experimentos en los que la concentración del tóxico iba creciendo secuencialmente. Todos los cultivos con las diferentes cantidades del contaminante fueron inoculados con el mismo número de células que los controles. Tanto los controles como los cultivos con las diferentes concentraciones del tóxico se mantuvieron en crecimiento durante 7 días.













CONTROLES 5 mLde medio $1 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^5$ células	CONCENTRACIONES CRECIENTES DEL TÓXICO → 5 mLde medio / $1 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^5$ células			
Sin tóxico	Dosis 1ª	Dosis 2ª	Dosis 3ª	Dosis nª
			
			
			
7 días de crecimiento	7 días de crecimiento			

Figura 5.1. Esquema experimental para la determinación de la dosis-efecto.

Tasa de crecimiento

El crecimiento se cuantificó mediante el conteo periódico de las células presentes en cada uno de los cultivos siguiendo el método más apropiado, lo cual dependía de la especie utilizada. En unos casos se empleó un conteo celular automático con un contador de partículas (Beckman Z2 counter Coulter); en otros, se procedió al empleo de uno manual utilizando una cámara de conteo Uriglass (Biosiga, Cona, Italy) y con la ayuda de un microscopio óptico invertido (Axiovert 35, Zeiss Oberkochen, Germany). El empleo de un procedimiento u otro dependía de variables tales como, la posibilidad de que los organismos generaran colonias, la densidad celular, el tamaño de las células,

etc. Por último para el conteo de las células de *Symbiodinium* utilizó una correlación entre absorbancia y población celular, para ello se trazó una curva de crecimiento midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm, utilizando un espectrofotómetro, siendo 0,92 la correspondiente una regresión lineal (r^2); la interpolación en dicha curva permitió estimar el crecimiento celular de las réplicas durante el desarrollo de los experimentos.

La toxicidad se estimó a través del cálculo de lo que se designa como tasa de crecimiento (m), medida como un parámetro denominado *malthusiano of fitness*, empleando la ecuación [5.1] la cual fue planteada por Crow y Kimura (Crow & Kimura, 1970).

$$m = \ln (N_t / N_0) / t \quad [5.1]$$

Dónde:

- N_t es el número final de células.
- N_0 es el número inicial de células.
- t es el tiempo (en este caso 7 días).

Inhibición de la fotosíntesis

Un parámetro complementario para evaluar la toxicidad de un compuesto es la eficiencia fotosintética. Dicho parámetro se puede estimar como el rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (Φ_{PSII}), para ello se utilizó un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada denominado ToxY-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). El fundamento de esta cuantificación se sustenta bajo la base de que cualquier tóxico que cause la limitación del flujo fotosintético de electrones ha de provocar una disminución proporcional del rendimiento cuántico efectivo (Φ_{PSII}).

El equipo ToxY-PAM emite dos tipos de pulsos lumínicos, los de luz no actínica (aquellos que no tienen la suficiente intensidad para poner en marcha la vía fotoquímica de la fotosíntesis) y los pulsos de luz actínica (pulsos de luz blanca saturada de $10.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) durante un periodo de 0,8 s. Este proceso permite obtener dos

medidas diferentes; por un lado el rendimiento cuántico después de la aplicación de un pulso de luz saturada (F) y, por el otro, el rendimiento cuántico máximo durante el pulso de luz saturada (Fm). Así, el rendimiento cuántico de la fotosíntesis se calcula de acuerdo a la ecuación [5.2]:

$$\Phi_{PSII} = (Fm - F)/Fm \quad [5.2]$$

El porcentaje de inhibición fotosintética, que es lo que realmente interesa cuando se desea determinar el efecto de un tóxico, se calculó comparando el rendimiento cuántico de la fotosíntesis (Φ_{PSII}) de los cultivos control con los correspondientes rendimientos cuánticos de los cultivos expuestos a las diferentes dosis de las sustancias contaminantes, mediante la fórmula de la ecuación [5.3]. Dicho porcentaje de inhibición se midió transcurridos los siguientes intervalos de tiempo a partir de la adición del tóxico: 0.1, 1, 24, 48 y 72 horas.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 (\Phi_{PSII} \text{ control} - \Phi_{PSII} \text{ muestra}) / \Phi_{PSII} \text{ muestra} \quad [5.3]$$

5.3.3. Determinación de las fuerzas evolutivas implicadas en la adaptación y estudio de la naturaleza de la adaptación: Experimento de ancestrales y derivadas

Experimento de ancestrales y derivadas

Dada la dificultad experimental en condiciones de laboratorio para desarrollar a gran escala el planteamiento propuesto por Gould (Gould, 1989), que pretendía demostrar la contribución de la contingencia histórica en el proceso de la evolución, se tiene como alternativa la posibilidad de realizar, aplicando sus mismas consideraciones teóricas, otros trabajos experimentales de microevolución.

Fueron Travisano y colaboradores en 1995 (Travisano *et al.*, 1995) quienes plantearon una experimentación diferente para conseguir el mismo objetivo que Gould; según la cual, en vez de reproducir la cinta de la vida secuencialmente, proponían un experimento donde muchos replicados independientes de una misma población, sometidos a una presión selectiva a largo plazo, se reproducen simultáneamente para poder comparar la evolución de un carácter específico entre las poblaciones ancestrales

y las derivadas. Por consiguiente, la variabilidad que se produzca entre las medias de cada valor considerado entre la población ancestral y la población derivada explicará la contribución de cada una de las fuerzas evolutivas en dicho cambio.

En su trabajo Trivisano y colaboradores plantearon que, inicialmente, una única población de idéntico genotipo habría de emplearse para crear una serie de replicados iguales entre sí, los cuales se colocarían en el mismo ambiente de crecimiento y se determinaría la media del carácter seleccionado. En ese momento, los autores sugirieron que cada uno de los replicados se transfiriera a las condiciones experimentales especificadas. De esta manera, se conseguirían dos baterías experimentales, una habría de mantenerse en las condiciones iniciales no selectivas (lo que se consideraría la población control o ancestral) y la segunda batería se tendría que transferir a las nuevas condiciones selectivas, por lo que ésta se consideraría la población experimental o derivada. Proponiendo que ambas se mantuvieran durante un número determinado de generaciones que permitieran determinaciones seriadas del carácter de interés.

Siguiendo con el planteamiento propuesto por Trivisano y colaboradores, en el punto inicial, la media de los valores del carácter de interés debería ser idéntica dentro de los límites estadísticos del error experimental. Si al finalizar el experimento, no se observaran cambios significativos entre las medias de la población ancestral y la derivada, se concluiría que no tendría por qué existir cambio evolutivo (figura 5.2.a). Alternativamente, se podría observar que no hubiera cambios significativos en la media pero que si existiera un cambio significativo en la varianza, en ese caso habría que atribuir la variación a la influencia del azar por deriva genética o por mutación (figura 5.2.b).

La tercera posibilidad que los autores sugirieron consistía en la posible observación de grandes cambios significativos en la media de la población derivada respecto a la población ancestral, pero sin manifestarse cambios significativos en la varianza entre los replicados. Este cambio habría de atribuírsele a la adaptación, porque el carácter de interés hubiera sido objeto de la selección natural o porque estuviera directamente relacionado con otro carácter que haya sido seleccionado (figura 5.2.c). La cuarta posibilidad que los autores plantearon era un cambio tanto de la media como de

la varianza, de lo que se deduciría que estarían participando conjuntamente el azar y la adaptación (figura 5.2.d).

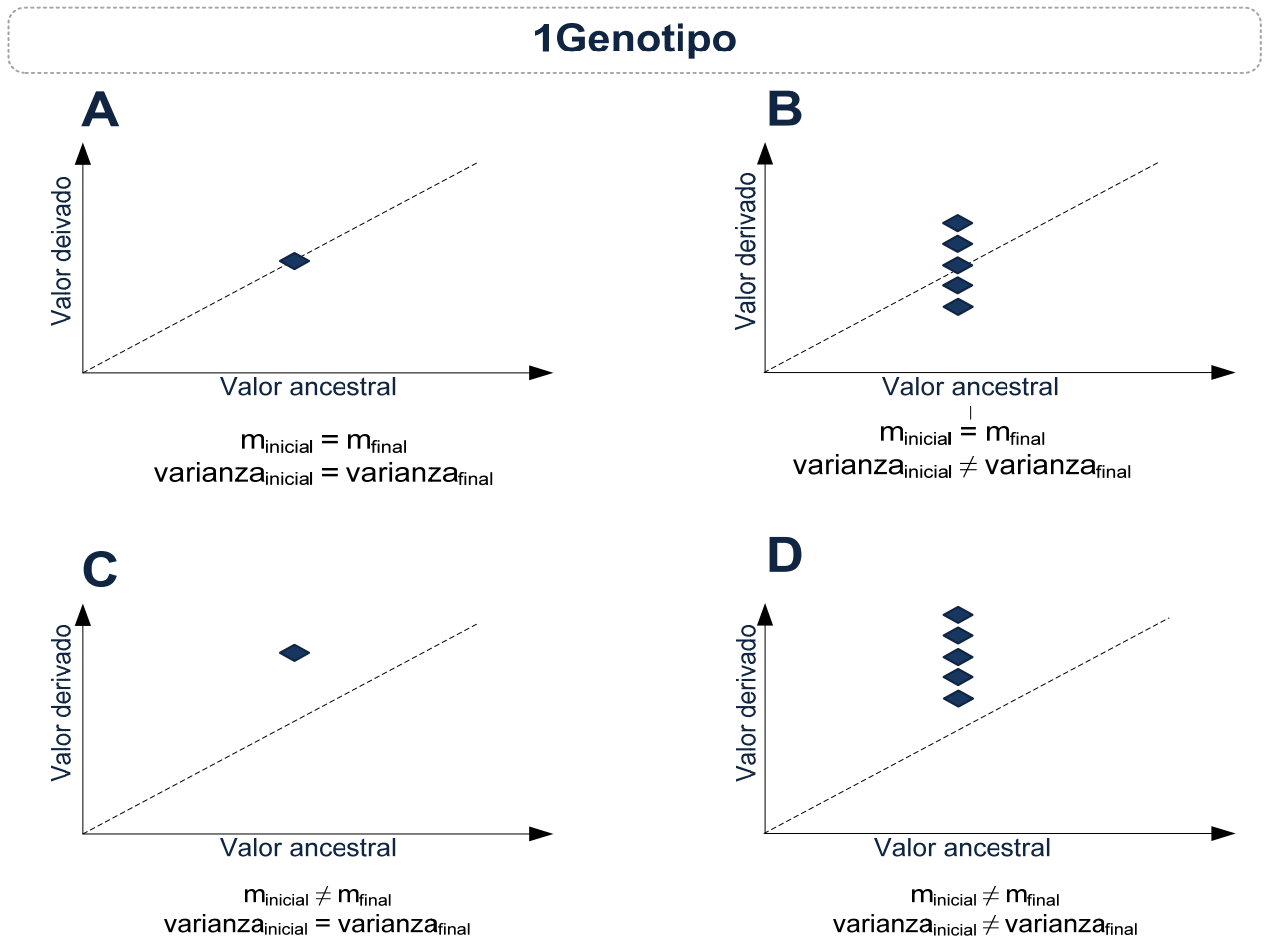


Figura 5.2. Representación esquemática de los efectos de la adaptación y el azar en el proceso evolutivo: a) no hay cambios evolutivos, b) efecto del azar, c) efecto de la adaptación, d) efecto conjunto de la adaptación y el azar.

Siguiendo con las hipótesis de Travisano y colaboradores, para intentar visualizar el efecto de la historia, habría de realizarse el mismo procedimiento pero empleando distintos genotipos ancestrales para poder comprobar la evolución de cada uno de ellos en el mismo ambiente. En una primera opción, podría ocurrir que la variación inicial en el valor del carácter de interés entre los distintos genotipos ancestrales fuera eliminada en la población derivada por el efecto de la adaptación, el azar o ambos, por lo que se

deduciría que la contribución de la historia al valor del carácter tendría que haber sido eliminada (figura 5.3.a). Por último, si se observara que la variación entre los replicados de la población derivada fuera estadísticamente significativa y similar en magnitud a la variación observada en la población ancestral, esto significaría que aunque el valor del carácter en la población derivada pudiera haber cambiado, todavía estaría reflejada la contribución a ese valor de la población ancestral y la huella histórica se habría mantenido (figura 5.3.b).

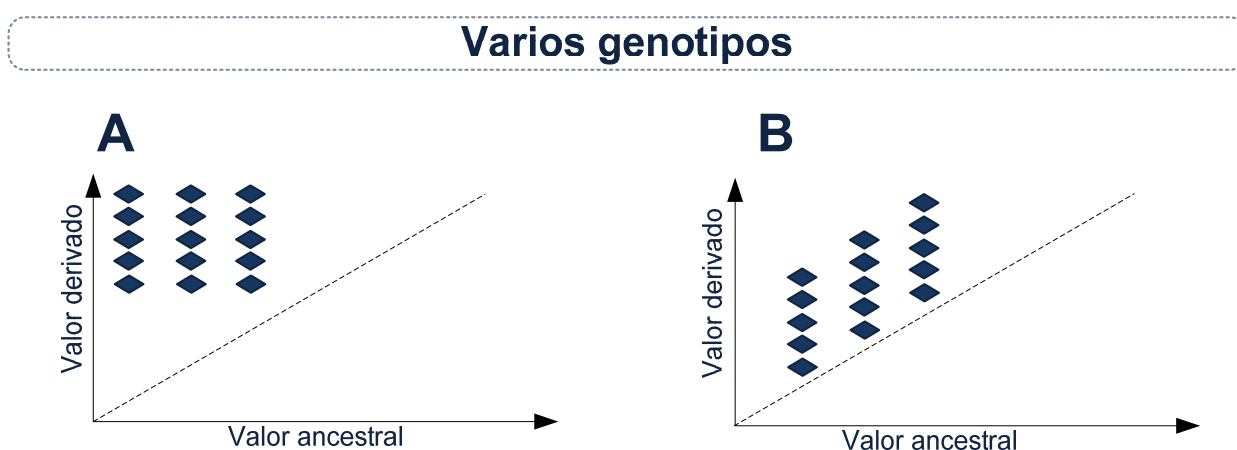


Figura 5.3. Representación esquemática del efecto de la historia en el proceso evolutivo: a) efecto de la historia eliminado por el efecto de la adaptación y el azar, b) el efecto de la historia se mantiene.

Hay que destacar que los efectos de la adaptación, el azar y la historia no son independientes, los tres factores pueden actuar simultáneamente en la evolución de un carácter en particular.

Procedimiento experimental

En el procedimiento experimental destinado a la determinación de las fuerzas evolutivas se utilizaron cultivos de las dos cepas de dinoflagelados de *A. minutum* (A11V y A12V), descritas en el apartado 5.1.2. A partir de ambas cepas se fundaron diez replicados, independientes de cada una, en las condiciones iniciales de cultivo ($T = 20^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH} = 8.0$ y 5 mL de medio de cultivo F/2). Con cada uno de los diferentes replicados se procedió a la estimación de los valores de los caracteres seleccionados, que en este caso concreto fueron la tasa de crecimiento celular y la toxicidad del propio microorganismo. Esta última se evaluó mediante el test Ridascreen PSP (Ridascreen®

Fast PSP SC, r-biopharm) que mide la cantidad de toxina PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) en el medio mediante un ELISA competitivo. La media de las medidas de dichos valores se correspondió con el valor inicial de la población ancestral. A partir de este momento, los replicados se transfirieron a las correspondientes condiciones de cultivo, obteniéndose así, diez nuevos replicados (controles) que se mantuvieron en las condiciones iniciales, es decir una temperatura de 20 °C y un valor de pH de 8.0 (población ancestral) y otros diez replicados que fueron sometidos a las nuevas condiciones de cultivo o condiciones selectivas (población derivada).

Las condiciones selectivas fueron elegidas con el fin de simular lo más fielmente posible las nuevas condiciones ambientales que se están produciendo en los ecosistemas oceánicos durante las últimas décadas, debido al cambio global de origen antropogénico. Concretamente, fueron seleccionados dos de los principales factores implicados en dicho cambio global:

- 1) El aumento de temperatura. Ya que, según la información recogida en el Panel Intergubernamental para el Cambio Climático, se ha predicho un aumento de 2 a 6 °C en los próximos 100 años (IPCC 2007; IPCC 2013).
- 2) La disminución del pH. Fenómeno debido a la disolución del CO₂ atmosférico en el océano (Caldeira & Wickett, 2003, 2005), tal como se ha indicado en la Introducción del presente documento.

En función de lo cual, las nuevas condiciones para la transferencia de los replicados fueron: 25 °C de temperatura y un valor de pH de 7.5. Para conseguir la reducción del valor de pH se añadía a los cultivos la cantidad adecuada de HCl 1N; dicho ajuste se efectuaba cada 3 días con el fin de evitar la alcalinización del medio debido a la actividad fotosintética de las células.

La tasa de crecimiento y la toxicidad celular de cada cepa se medían cada 6 meses. Adicionalmente, de forma periódica los replicados se iban transfiriendo a medio nuevo, en la cepa *A. minutum* A11V cada 12-18 días y en la cepa *A. minutum* A12V cada 17-25 días, para conseguir cinco generaciones de división binaria antes de la siguiente transferencia (figura 5.4.). Siempre cada transferencia se efectuaba con un inóculo de

$2.5 \cdot 10^3$ células/mL del cultivo anterior en un volumen de 5 mL de medio nutritivo fresco.

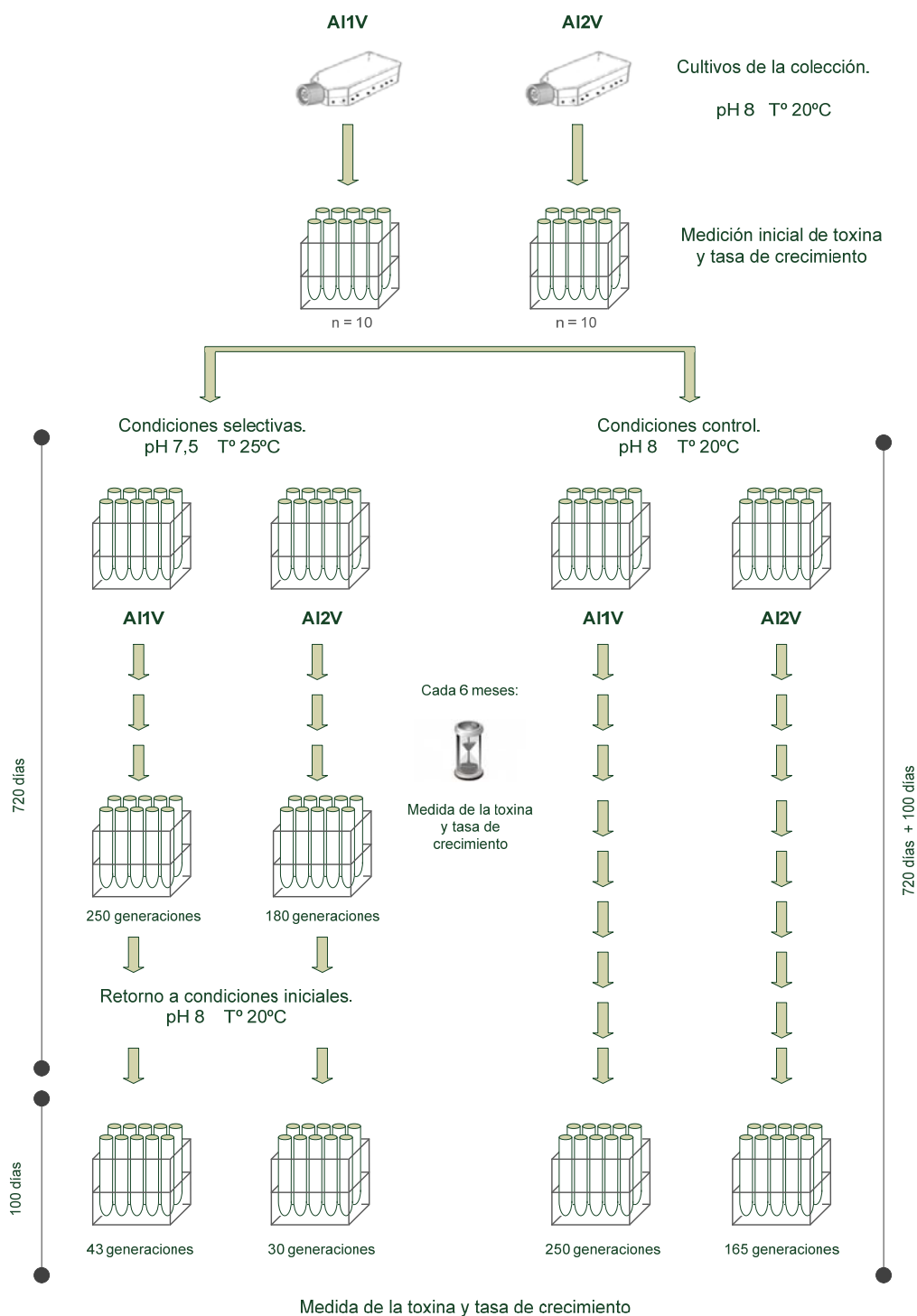


Figura 5.4. Esquema para la determinación de las fuerzas evolutivas (poblaciones ancestrales y derivadas).

Los replicados fueron mantenidos en las citadas condiciones hasta que no se registraron diferencias significativas en los valores observados para los dos caracteres seleccionados en tres medidas consecutivas. Los valores que se iban obteniendo fueron analizados mediante análisis de la varianza unidireccional (ANOVA). Esta investigación abarcó un total de 720 días, durante los cuales se consiguieron 250 generaciones en la cepa A11V y 180 generaciones en la cepa A12V, para la población ancestral, junto con 220 generaciones en la cepa A11V y 165 generaciones en la cepa A12V, para la población derivada. Por último, transcurrido dicho periodo de tiempo se realizó la medida final de la tasa de crecimiento y la toxicidad celular de todos los replicados.

Para la determinación de la contribución de las distintas fuerzas evolutivas (adaptación, azar e historia), se procedió a la realización de un estudio comparativo de los valores de la tasa de crecimiento y de la toxicidad, medidos ambos parámetros al inicio y al final de todo el proceso experimental descrito, por medio de distintas aproximaciones estadísticas:

- Los efectos de la adaptación se definen a través de los cambios significativos observados en la media de los valores de interés entre las condiciones iniciales y finales, utilizando un test de t-Student con un nivel de confianza del 95 %.

- Los efectos del azar y de la historia fueron determinados por medio de un análisis de la varianza anidado (ANOVA) a dos niveles, es decir, disponiendo de dos cepas y diez replicados por cepa efectuando tres medidas de la tasa de crecimiento y la toxicidad por cada replicado. La homogeneidad de varianzas se chequeó por el test de Bartlett (Bartlett, 1937).

- Con el fin de cuantificar la contribución de la historia y del azar se utilizó la raíz cuadrada de la varianza de ambos componentes. De este modo, se pudo comparar la contribución de cada una de las fuerzas evolutivas de un modo cuantitativo (adaptación, azar e historia).

Naturaleza de la adaptación: Distinción entre cambio fisiológico (aclimatación) o adaptación genética

Con el objeto de diferenciar si la adaptación era como resultado de un proceso fisiológico o lo era por cambios de tipo genético, se realizó el siguiente protocolo experimental: Los cultivos controles fueron transferidos a las condiciones selectivas ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH} = 7.5$) durante 20 días (lo que supuso ocho generaciones en la cepa A11V y seis generaciones en la cepa A12V). Transcurrido dicho periodo de tiempo se midió de la tasa de crecimiento.

La adaptación genética se corresponde con la diferencia entre la tasa de crecimiento de las células derivadas en condiciones selectivas y la tasa de crecimiento de las células derivadas de las condiciones control y transferidas, después, a las condiciones selectivas durante 20 días (replicados I vs III, figura 5.4.). La aclimatación o adaptación fisiológica se corresponde con el aumento en la tasa de crecimiento de la batería de células derivadas de las condiciones control y transferidas, después, a las condiciones selectivas durante 20 días en comparación con el crecimiento de las células derivadas en condiciones control (replicados III vs II, figura 5.4.).

5.3.4. Determinación del origen de la adaptación y aparición de las mutaciones: Experimento del Análisis de Fluctuación y test de Newcombe

Análisis de Fluctuación

El análisis de fluctuación se considera un conjunto de procedimientos, experimentales y estadísticos, que permiten conocer y analizar la naturaleza de la mutación que proporciona resistencia frente a un determinado agente selectivo, es decir, si la mutación que permite la adaptación es preadaptativa, ocurre espontáneamente al azar antes del contacto con el agente selectivo o si por el contrario es postadaptativa, produciéndose dicha mutación como consecuencia directa del contacto con el tóxico. Además, también permite conocer la tasa de mutación mediante la utilización del estimador P_o (Luria & Delbück 1943). Inicialmente este protocolo experimental fue diseñado para su aplicación a cultivos cuyo crecimiento se daba en placa de cultivo, sin embargo gracias a la modificación planteada por López Rodas y colaboradores en el

2001 hoy en día es posible su utilización en cultivos líquidos (López Rodas *et al.*, 2001).

Procedimiento experimental

Durante el desarrollo de este trabajo experimental se realizaron trece análisis de fluctuación modificados para cultivos líquidos con el objeto de poder diferenciar entre la hipótesis de la mutación espontánea o la hipótesis de la adaptación adquirida. En la tabla 5.VII. se especifican las especies fitoplanctónicas utilizadas y las sustancias tóxicas y agentes selectivos empleados en cada análisis de fluctuación ejecutado.

Tabla 5.VII. Especies de Fitoplancton, sustancias tóxicas y dosis empleadas en los análisis de fluctuación.

Microalga	Agente selectivo	Dosis (ppm)	Forma de presentación
<i>S. intermedius</i>	Lindano	10	C ₆ H ₆ Cl ₆
<i>S. intermedius</i>	Lindano	30	C ₆ H ₆ Cl ₆
<i>S. intermedius</i>	Lindano	90	C ₆ H ₆ Cl ₆
<i>S. intermedius</i>	Lindano	120	C ₆ H ₆ Cl ₆
<i>D. chlorelloides</i>	TBT	10	C ₁₂ H ₂₈ Sn
<i>T. suecica</i>	TBT	10	C ₁₂ H ₂₈ Sn
<i>N. ramossisima</i>	TBT	10	C ₁₂ H ₂₈ Sn
<i>Prochloron</i> sp.	TBT	10	C ₁₂ H ₂₈ Sn
<i>D. chlorelloides</i>	Cadmio	30	Cd(NO ₃) ₂ · 4(H ₂ O)
<i>D. chlorelloides</i>	Plomo	75	Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ · 3H ₂ O
<i>D. chlorelloides</i>	Níquel	3	NiCl ₂
<i>D. chlorelloides</i>	Iridio	10	Cl ₆ IrNa ₂ · 6H ₂ O
<i>S. Clade C1</i>	Temperatura	32,2 °C	-

En cada uno de ellos, se fundaron dos baterías de experimentos bien diferenciadas entre sí (figura 5.5.):

- La primera batería, denominada Set 1, constaba de 50 a 100 tubos con 5 mL de medio BG11 o F/2 (según se estuviera trabajando con una especie de agua dulce o marina, respectivamente) y de medio IMK en el caso de *Symbiodinium*. Cada tubo fue inoculado con 100 células (N_0), este número de células se consideró lo suficientemente pequeño como para poder asegurar la ausencia de mutantes preexistentes en dicho inóculo. Dichos cultivos se dejaron crecer en condiciones no selectivas hasta que se alcanzó una población de $1 \cdot 10^5$ células (N_t) y, en ese momento, se suplementó al medio la dosis del agente selectivo elegido que inhibía el 100 % del crecimiento celular. Posteriormente, los cultivos se mantuvieron en las citadas condiciones durante 60 - 75 días, por considerar que éste era un periodo de tiempo suficientemente largo para permitir crecer a las células resistentes.
- La segunda batería, denominada Set 2 o Set control, constaba de 25 a 30 tubos con 5 mL de medio de cultivo que se inocularon con $1 \cdot 10^5$ células de la misma población parental que el Set 1. Directamente, y por lo tanto sin esperar ningún tiempo adicional, se añadió al medio la dosis del agente selectivo elegido que inhibía el 100 % del crecimiento celular. Estos cultivos, también, se mantuvieron en las mismas condiciones durante 60 - 75 días.

Al final del periodo de incubación las células resistentes que aparecieron en sendos cultivos fueron contadas siguiendo el método más apropiado dependiendo de la especie utilizada; es decir, mediante contaje celular automático utilizando un contador de partículas (Beckman Z2 counter Coulter), bien mediante contaje manual utilizando una cámara Uriglass (Biosiga, Cona, Italy) y un microscopio óptico invertido (Axiovert 35, Zeiss Oberkochen, Germany), para el *Symbiodinium* se midió la absorbancia a 750 nm.

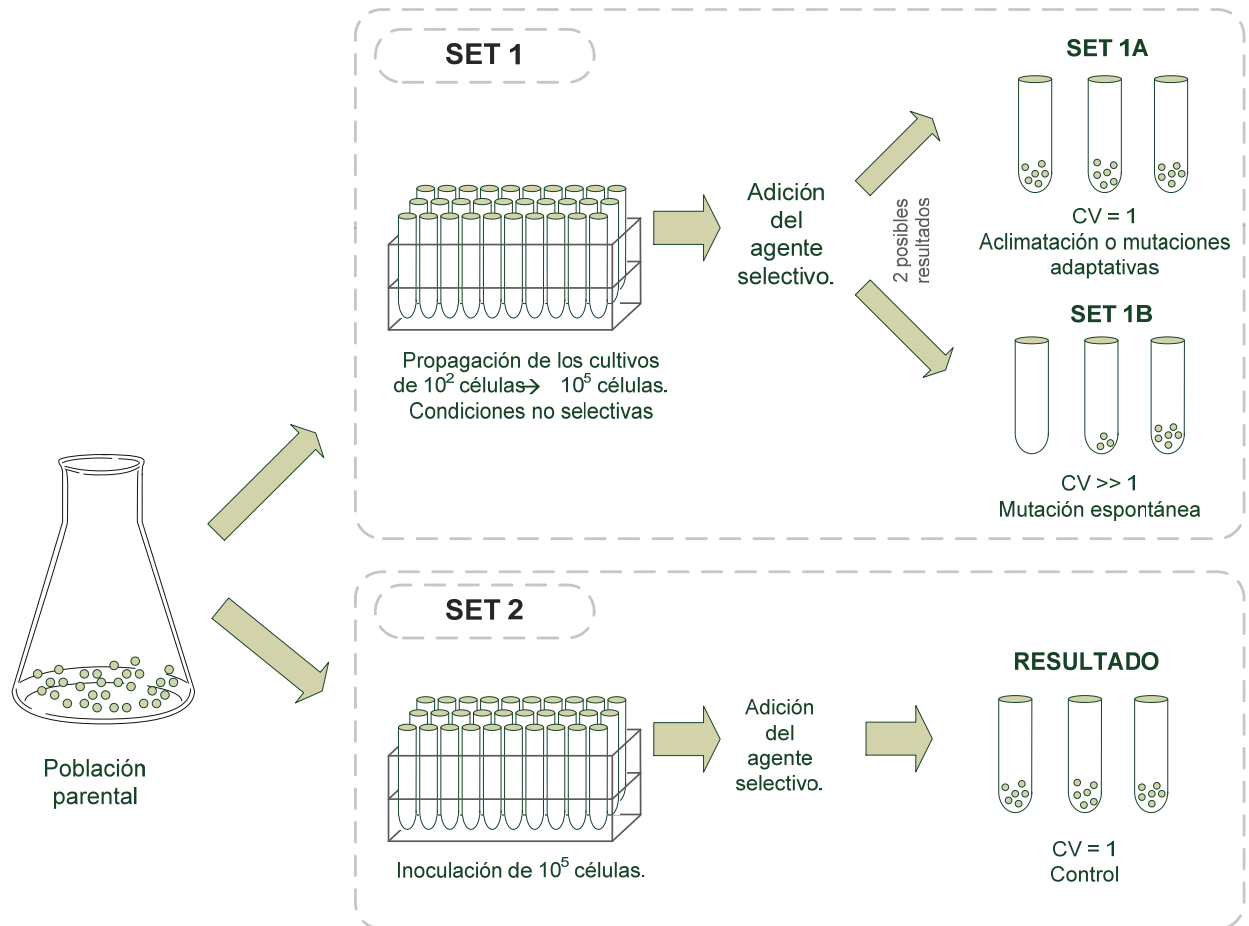


Figura 5.5. Esquema experimental para la realización del análisis de fluctuación.

De acuerdo con el protocolo de Luria y Delbrück (Luria & Delbrück, 1943) se pueden observar resultados diferentes en el Set 1 y cada uno de ellos se interpretaría como un resultado diferente de adaptación. A continuación se concretan dichas posibilidades:

- Si las células resistentes aparecieran como consecuencia de la presencia del agente selectivo, ya sea por aclimatación o por mutaciones postadaptativas, en todos los tubos se observaría crecimiento y la varianza que se obtuviera, entre el número de células de cada cultivo, sería muy baja (figura 5.5., Set 1A). Se presupone que todas las células tienen la misma posibilidad de adaptarse a la nueva situación ambiental y, por lo tanto, de desarrollar resistencia. Por lo que el coeficiente de variación (CV), definido como la varianza dividido entre la media, sería relativamente bajo y cercano a 1 y se ajustaría a la distribución de Poisson (entendida ésta como una distribución de probabilidad, que con una

frecuencia de ocurrencia media, indica la probabilidad para que ocurra un número de hechos durante un tiempo determinado).

- Si las células resistentes aparecen como consecuencia de raras mutaciones espontáneas que ocurren al azar antes de la exposición al agente selectivo, se observaría crecimiento solo en algunos tubos. Si la mutación es al azar, ésta puede ocurrir en cualquier momento y en cualquier división celular. En el caso de que ocurriera pronto se observarían muchas células resistentes; si por el contrario, ocurriera en un punto cercano al final del experimento se observaría un menor número de células resistentes y si, por último, no ocurriera, no se observaría crecimiento alguno. La distribución de las células resistentes no se ajustaría a la distribución de Poisson (figura 5.5., Set 1B). En este caso, el coeficiente de variación sería alto y mucho mayor de 1.
- Puede ser observada una última posibilidad, ésta supondría que no existiera crecimiento en ningún tubo, lo cual indicaría la total ausencia de células resistentes frente al compuesto al que fueron expuestas.

El Set 2 se considera como control experimental del procedimiento, representa la variación de la población parental y el error experimental. En el Set 2 es necesario observar crecimiento en todos los tubos, ya que como el inóculo fue realizado con $1 \cdot 10^5$ células se presupone que era un número lo suficientemente elevado como para presentar mutantes pre o postadaptativos y, por tanto, la variación en el número de células debería de ser parecida.

Por último, de modo complementario, se procedió al estudio comparativo los coeficientes de variación (CV) de los dos sets:

- Si el CV del Set 1 fuera parecido al CV del Set 2, se concluiría que la adaptación fue por aclimatación fisiológica o por mutaciones postadaptativas, esto es, producidas después de la exposición al agente tóxico.

- Si el CV del Set 1 fuera significativamente mayor que el CV del Set 2 significaría que la adaptación fue por mutaciones espontaneas existentes anteriores a la exposición del agente toxico.

Cálculo de la tasa de mutación

La tasa de mutación (μ) se calculó a través del estimador P_0 , despejando el valor de μ a partir de la ecuación [5.4.]:

$$P_0 = e^{-\mu(N_t - N_o)} \quad [5.4]$$

Donde:

- P_0 es la proporción de cultivos que no presentan crecimiento en el Set 1.
- N_o es el tamaño inicial de la población celular.
- N_t es el tamaño de la población celular en el momento que se añade el agente selectivo.
- $N_t - N_o$ corresponde al número de divisiones celulares.

Calculo del equilibrio de mutación - selección

Si la mutación de alelo sensible a alelo resistente es recurrente y, además, si esa mutación provoca un lastre en el genotipo resistente, como por ejemplo menor tasa de crecimiento frente al sensible en ausencia del agente selectivo, la mayoría de los mutantes resistentes serían eliminados por la selección natural tarde o temprano. A pesar de ello, siempre habría un porcentaje de resistentes que no serían eliminados y permanecerían en la población.

La media de esos mutantes resistentes se determinó por el equilibrio entre la tasa de mutacion (μ) y el coeficiente de selección (s), de acuerdo con la ecuación [5.5] postulada por Kimura y Maruyama (Kimura & Maruyama, 1966):

$$q = \mu / (\mu + s) \quad [5.5]$$

Donde:

- q es la frecuencia del alelo resistente.
- s es el coeficiente de selección.
- μ es la tasa de mutación.

A su vez, el coeficiente de selección se deduce de la ecuación [5.6]:

$$s = 1 - (m_r / m_s) \quad [5.6]$$

Donde:

- m_r y m_s son la tasa de crecimiento del resistente y del sensible, respectivamente, medidas en condiciones no selectivas.

Comprobación de la resistencia de los mutantes obtenidos en el análisis de fluctuación frente al TBT

Una vez obtenidas células resistentes de las especies ensayadas con el análisis de fluctuación frente al tributilestaño (TBT) puro de Sigma-Aldrich, se planificó la experimentación que permitiera comprobar si eran, asimismo, resistentes frente a una pintura comercial *antifouling*, compuesta fundamentalmente por TBT, destinada a minimizar la adhesión de organismos en la superficie sumergida de los barcos. Para ello, se utilizaron placas de poliestireno, las cuales disponían de seis pocillos cada una con 10 mL de capacidad (Nunclon Superficie Delta, Dinamarca). Se procedió a pintar la parte inferior de treinta pocillos con una pintura *antifouling* con TBT (Hempel, Polinya, Barcelona, España); una vez aplicada la pintura y tras un periodo de tiempo, a temperatura ambiente, de 24 horas destinado a que ésta secara, se añadieron 10 mL de medio F/2 o BG-11 fresco a cada placa. Posteriormente seis de estos pocillos fueron inoculados con $5 \cdot 10^5$ células de tipo salvaje de *N. ramossisima* sensibles al TBT; otros seis también fueron inoculados con $5 \cdot 10^5$ células de *T. suecica* y, por último, otros tres con el mismo número de células de *D. chorelloides*. Adicionalmente, y de forma paralela, la parte inferior del mismo número de pocillos fueron inoculados también con $5 \cdot 10^5$ células, pero en este caso se trataba de mutantes resistentes a TBT para cada especie, obtenidas de los análisis de fluctuación respectivos. Las placas se mantuvieron

a 20 °C bajo luz continua de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR en la superficie de los recipientes de cultivo y conservadas durante 15 días para permitir el crecimiento celular.

Análisis de Newcombe

El análisis de Newcombe es un experimento diseñado para estudiar de una manera más gráfica y menos cuantitativa la naturaleza de la mutación que permite la adaptación frente a un agente selectivo. Este procedimiento fue utilizado por primera vez por Howard B. Newcombe en 1949 (Newcombe, 1949) y mediante un experimento sencillo de réplica en placa consiguió discernir entre las dos posibilidades, por un lado que las mutaciones sean espontáneas y anteriores a la exposición y, por otro, que sean posteriores y consecuencia de dicha exposición.

En el presente trabajo también se realizó este clásico análisis de Newcombe, en este caso, para confirmar los resultados obtenidos con el análisis de fluctuación cuando se expusieron las especies *T. suecica* y *N. ramossissima* al tribultilestaño (TBT).

Procedimiento experimental

Para cada especie (*T. suecica* y *N. ramossissima*), se prepararon veinte placas de cultivo en las que se colocó el medio de cultivo F/2 solidificado con un 2 % de agar; posteriormente, cada una de ellas se inóculo con $5 \cdot 10^4$ células de la misma población parental. Se mantuvieron las placas en crecimiento durante 20 días en condiciones ambientales estándares en ausencia de TBT. Pasados los 20 días, en diez de las placas las colonias de microalgas crecidas se distribuyeron por toda la superficie de la misma, mientras que las otras diez placas se mantuvieron intactas. Las placas fueron rociadas con 10 ppm de TBT disuelto en medio F/2 y se incubaron durante 15 días más (figura 5.6.). Según el mecanismo de adaptación implicado pueden observarse dos resultados diferentes:

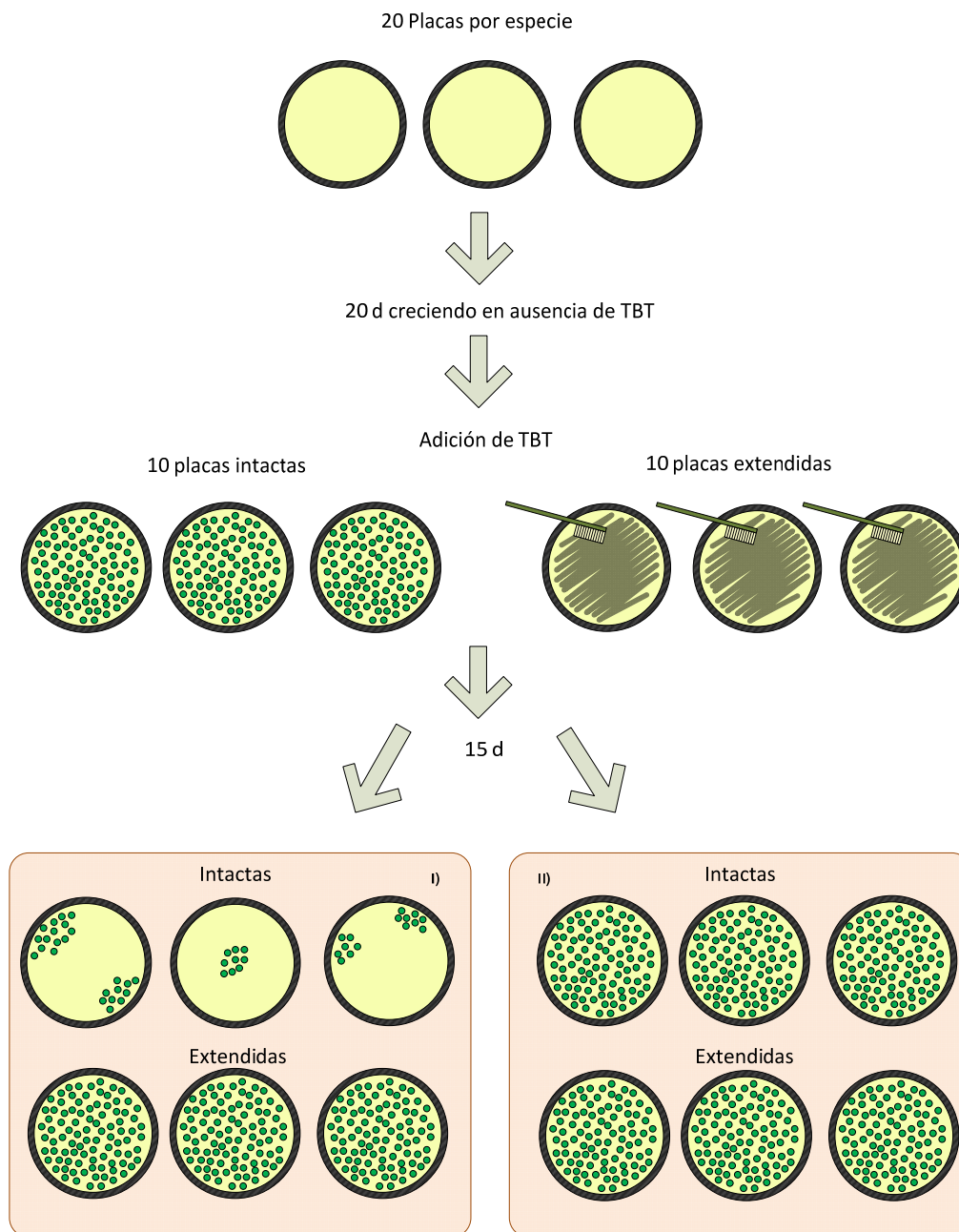


Figura 5.6. Representación esquemática del análisis de Newcombe.

- Si las células resistentes hubieran aparecido como consecuencia de raras mutaciones espontáneas durante el crecimiento anterior a la exposición del TBT, cada resistente habría originado una sola colonia en las placas mantenidas intactas. Adicionalmente, si cada mutante resistente originara una colonia de células resistentes y éstas se distribuyen por toda la placa, se observaría crecimiento de colonias por toda la superficie de ésta.

- Si la resistencia ocurriera por aclimatación fisiológica o por mutaciones postadaptativas, todas las células originadas tras el periodo de crecimiento inicial tendrían las mismas probabilidades de ser resistentes. El hecho de distribuir las colonias solo originaría la extensión de células de una población homogénea. En consecuencia, el número de colonias en las placas intactas y en las que ha habido distribución sería muy parecido.

5.3.5. Determinación del límite de la adaptación: Experimento de *ratchet*

Experimento de *ratchet*

El experimento de *ratchet*, término utilizado en la literatura anglosajona (o el conocido como “trinquete”, equivalente en la de lengua española), maximiza simultáneamente la selección natural y la aparición de nuevas mutaciones en las poblaciones. Principalmente, debido a que se mantienen grandes poblaciones experimentales de células en división, lo que asegura una mayor probabilidad de aparición de mutaciones y, simultáneamente, mantiene una presión de selección elevada, asegurando así el mantenimiento de la mutación en la población.

Este diseño experimental fue aplicado, por primera vez, por Reboud y colaboradores (Reboud *et al.*, 2007), en dicho trabajo se expuso a la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* a dosis crecientes del herbicida atrazina consiguiendo estudiar, a largo plazo, la evolución de la resistencia del microorganismo frente a dicho agente selectivo. Uno de los principales inconvenientes que plantea el experimento de *ratchet* es no conocer de antemano la presión de selección adecuada a aplicar, ya que si se somete a la población a una alta presión de selección el número de individuos se reduce drásticamente; pero, por el contrario, si la presión de selección es muy baja realmente no se está seleccionando la mutación beneficiosa. Con el objetivo de solventar este problema, estos mismos autores sometieron a la población de *C. reinhardtii* a distintas concentraciones de herbicida simultáneamente constituyendo cada una de ellas una presión de selección distinta. Posteriormente, fue mejorado por Orellana y colaboradores (Orellana *et al.*, 2008) así como, por Huertas y colaboradores (Huertas *et al.*, 2010 y 2011) para estudiar el límite de la adaptación de varias especies de microalgas frente a antibióticos, herbicidas y metales pesados

En general, este procedimiento es interesante aplicarlo no sólo para conocer la máxima capacidad de un microorganismo expuesto a un compuesto concreto sino, también, para averiguar la adaptación diferencial que pueden tener las distintas especies pertenecientes al fitoplancton según sus características intrínsecas. En este sentido, Huertas y colaboradores (Huertas *et al.*, 2010, 2011) en sendos trabajos expusieron a distintas especies pertenecientes a los grandes grupos fitoplanctónicos a dos de los serios problemas contemplados actualmente en el cambio global: la liberación de herbicidas en los ecosistemas y el aumento de temperatura. En donde se evidenció que la capacidad de las diferentes especies para adaptarse se puede explicar en relación al grupo taxonómico, ploidía, tasa de crecimiento y la preferencia de hábitat. Dicha capacidad, sin duda, provocará cambios en la composición de la comunidad fitoplanctónica, como la sustitución de individuos y especies más sensibles por otras más resistentes.

Concretamente, en el presente trabajo el protocolo de *ratchet* se realizó en dos ocasiones, una para averiguar la máxima capacidad de adaptación de diversas especies de microalgas a la presencia de cobre en el medio y, en una segunda ocasión, lo que se pretendía era encontrar la máxima temperatura que pudiera soportar la microalga *Symbiodinium* Cepa C1.

Protocolo experimental

Límite de la adaptación al cobre

En el primer experimento de *ratchet* (figura 5.7) se emplearon seis cepas de tres especies diferentes (tabla 5.VIII.) que se expusieron a dosis crecientes de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), comenzando por 1, 3 y 10 μM .

Tabla 5.VIII. Cepas fitoplanctónicas empleadas en el experimento de *ratchet*.

Microalga	Contaminante	Forma de presentación
<i>D. chlorelloides</i>	Sulfato de cobre	CuSO ₄ ·5H ₂ O
<i>S. intermedius</i> (SiM)		
<i>S. intermedius</i> (SiD)		
<i>M. aeruginosa</i> (Ma3D)		
<i>M. aeruginosa</i> (Ma6D)		
<i>M. aeruginosa</i> (Ma7D)		

En el punto inicial de este desarrollo experimental, lo que se corresponde con el primer ciclo de *ratchet*, se colocó una batería de doce cultivos por cada cepa de fitoplancton; dicha batería constaba de tres controles de células no expuestas a las condiciones selectivas, y tres réplicas de cada cultivo donde los microorganismos estaban expuestos a tres dosis crecientes de sulfato de cobre. Las dosis seleccionadas para este primer ciclo fueron, respectivamente, de 1, 3 y 10 μM de la sal de cobre. En este protocolo, cada ciclo de *ratchet* supone un aumento de la concentración del agente selectivo situándola tres veces más alta que la dosis del anterior ciclo, por lo que, en este caso, los siguientes ciclos suponían concentraciones de sulfato de cobre de 30, 90 y 270 μM .

Todos los cultivos se iniciaron con 5 mL de medio que se inocularon con $3 \cdot 10^5$ células, los cuales se mantuvieron en dichas condiciones durante 20 días, tiempo que se consideró el suficiente para que los cultivos alcanzaran una concentración celular elevada. Transcurrido dicho tiempo establecido de cultivo, se comparó el crecimiento algal producido en los cultivos control con el correspondiente crecimiento de los cultivos expuestos a la presencia de cobre en el medio. Los primeros aportaban el número final de células que puede desarrollarse en un cultivo en crecimiento con consideraciones ambientales óptimas. Cada cultivo sometido a selección que alcanzaba un número final de células similar o superior al del control, lo que indicaría una buena adaptación a las condiciones selectivas, fue transferido a la dosis correspondiente al siguiente ciclo de *ratchet*; repitiéndose así indefinidamente el proceso. Por el contrario,

los cultivos que mostraban una disminución del crecimiento respecto al control, lo que significaba en ese caso ausencia de adaptación, se mantuvieron en las mismas condiciones durante 20 días más, con el fin de permitir la aparición de mutantes más adaptados y su posterior crecimiento.

El final del protocolo se estableció tras seis ciclos de ratchet sin observar crecimiento de los cultivos experimentales. La máxima dosis que permitió el crecimiento de las células se consideró la máxima capacidad de adaptación al agente selectivo (en este caso el sulfato de cobre). Es necesario recalcar que el número de ciclos de ratchet depende de la especie empleada, ya que se toma la capacidad de crecimiento como factor indispensable cuando se pretende diferenciar la máxima capacidad de adaptación a las condiciones selectivas de las distintas especies.

Así, mediante las clásicas ecuaciones de Novick y Szilard (Novick & Szilard, 1950), ecuaciones [5.7] y [5.8], se estableció el número de generaciones acontecidas durante los diferentes ciclos del *ratchet* y esto permitió establecer un análisis comparativo entre las diferentes réplicas.

$$N_t = N_0 2^{t/T} \quad [5.7]$$

$$g = t / T \quad [5.8]$$

Donde:

- N_t es el número de células a tiempo t .
- N_0 es el número de células en el momento inicial.
- t es el tiempo.
- T es el tiempo de generación.
- g es el número de generaciones.

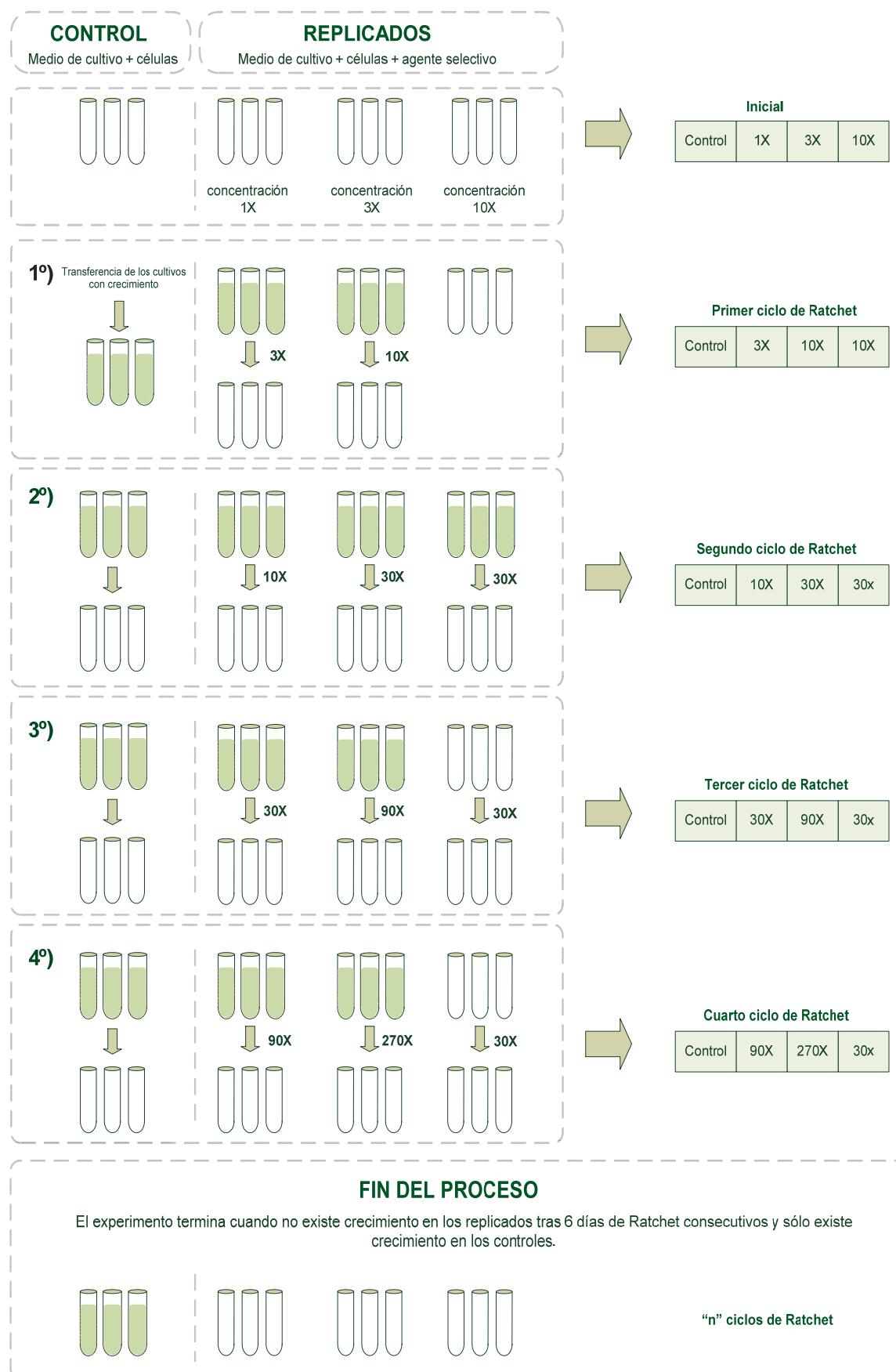


Figura 5.7. Esquema del experimento de ratchet.

Distinción entre cambio fisiológico (aclimatación) o adaptación genética

Con el fin de distinguir entre los dos procesos de adaptación, fisiológica o genética, se cuantificó la diferencia de crecimiento entre los distintos replicados de una misma dosis y ciclo. Como cada réplica se considera una población independiente se puede observar diferencias en resistencia al agente selectivo:

- Si la resistencia ocurriera por cambios fisiológicos, todos los replicados tendrían la misma probabilidad de desarrollar dicha resistencia. El número de generaciones transcurridas antes de la transferencia a un ciclo superior debería de ser la misma en todas las réplicas.
- Si la resistencia ocurriera por adaptación genética, los replicados tendrían distinta probabilidad de que en la población existente hubiera mutantes resistentes. El número de generaciones transcurridas para alcanzar la resistencia debería de ser diferente entre las réplicas.

Cuando la presión de selección es baja, los dos fenómenos pueden coexistir al mismo tiempo. Sin embargo, a dosis más altas cuando la presión de selección es más fuerte, son necesarios los mecanismos genéticos para asegurar la adaptación y la supervivencia.

Límite de la adaptación frente a la temperatura en *Symbiodinium* Cepa C1

En un segundo trabajo, se realizó un *ratchet* modificado, aunque basado en los mismos principios y consideraciones teóricas que el original: incrementar progresivamente la presión de selección y mantener un gran tamaño de población, con el objetivo de maximizar la selección natural y alcanzar la máxima capacidad de adaptación. Para ello en este caso se utilizó la microalga *Symbiodinium* Cepa C1 y como agente selectivo la elevación de la temperatura, como consecuencia de especial sensibilidad al efecto del calentamiento global.

El procedimiento experimental se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: en primer lugar se establecieron las diferentes temperaturas que se iban a emplear en el

experimento, así se fijó el valor de 26 °C, que constituyó la temperatura control, es decir, dónde los cultivos no son sometidos a ninguna presión de selección; posteriormente, se acordaron valores de temperatura crecientes hasta llegar a la temperatura letal situada en 32,2 °C. Dentro de este intervalo las temperaturas seleccionadas fueron: 28 °C, 29,8 °C, 31,5 °C y 32,2 °C. En cada temperatura se colocaron dieciseis réplicas idénticas del *Symbiodinium* Cepa C1 con una concentración celular comprendida entre $4 \cdot 10^5$ y $6 \cdot 10^5$ cels/mL, valor suficiente para favorecer la aparición de mutantes pero sin llegar a la saturación del cultivo demasiado rápido. Los cultivos se mantuvieron en las condiciones mencionadas durante 20 días. Cada 4 días se monitorizaba el crecimiento de cada réplica, leyendo la absorbancia a 750 nm, de acuerdo con la correlación establecida previamente y valorando la eficiencia fotosintética “*maximum quantum yield*” mediante un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada (PAM). Cuando los cultivos sometidos a selección alcanzaban un número final de células y una eficiencia similar al control (indicando, en ese caso, una adecuada adaptación a las condiciones selectivas) se transferían al ciclo de temperatura inmediatamente superior, denominado segundo ciclo. Eligiendo, en cada tanda de las transferencias, de las dieciseis réplicas las cuatro réplicas que mostraban un mayor crecimiento y los más eficientes fotosintéticamente, así como cuatro réplicas del control para tener un crecimiento de referencia con el que comparar los diferentes replicados. Por lo que se realizaron cuatro transferencias al segundo ciclo de los replicados iniciales en cada temperatura. Asimismo, los cultivos que mostraban una disminución significativa del crecimiento respecto al control, lo que indicaba que no se había conseguido todavía la adaptación o los menos eficientes en cuanto a crecimiento y fotosíntesis, se mantenían en las mismas condiciones iniciales con el fin de permitir, con un periodo de tiempo mayor, la aparición de mutantes más adaptados para su posterior selección.

Para el tercer ciclo y ciclos superiores se usaban los mismos criterios para la realización de las transferencias y cada replicado se mantenía de forma independiente, pudiendo haber tubos que pasaran de segundo a tercer ciclo habiendo pasado por tres temperaturas diferentes o tubos que pasaran de un tercer ciclo a un cuarto ciclo habiendo crecido en las cuatro temperaturas seleccionadas para el experimento (28 °C, 29,8 °C, 31,5 °C y 32,2 °C). El final de protocolo se estableció tras 100 días sin observar

crecimiento en la cámara de temperatura superior 32,2°C, valor que era letal para todos los replicados que eran transferidos a dicha cámara.

5.3.6. Determinación y estudio de especies invasoras transportadas mediante el biofouling de los barcos

Muestreo

Con la experimentación realizada en esta ocasión, se pretendía diferenciar entre aquellas especies de microalgas que, en un determinado ambiente, pudieran ser potencialmente invasoras y entre aquellas consideradas de naturaleza autóctona de dicho entorno. Para la realización de este estudio, fue necesario disponer de un número suficientemente elevado de muestras que permitiera la realización de los correspondientes ensayos. Con este objetivo, se buscaron las microalgas que pudieran estar adheridas al casco de aquellos barcos que hubieran realizado previamente largos viajes transoceánicos. Concretamente, durante el verano del año 2010, se seleccionaron algunos buques que llegaban a determinados puertos mediterráneos de la costa este española, en particular los de Sagunto, Burriana, Castellón y Gandía de la Comunidad Valenciana. Se eligieron aquellos que hubieran recorrido más de 2000 millas náuticas en su singladura por los océanos Índico y Atlántico y que hubieran permanecido, al menos, dos meses en el mar. Para la toma de muestras se realizó un raspado con hisopos microbiológicos de la pintura *antifouling*.

El número de buques incluidos en el estudio fue de 27 (25 cargueros y 2 barcos cisterna). El muestreo se realizó inmediatamente después de que los barcos hubieran atracado en el muelle, para evitar la contaminación biológica y la colonización por el fitoplancton local; además, debido a que el estado de la pintura *antifouling* puede variar considerablemente con el tiempo, sólo se obtuvieron muestras de los buques que presentaban la capa *antifouling* en buen estado (sin incrustaciones macroscópicas detectables como percebes, mejillones, etc). Utilizando estos criterios, se asumió que los compuestos *antifouling* estaban todavía presentes en el sistema de revestimiento. Adicionalmente, para la confirmación del hecho de que la capa de pintura estuviera constituida por TBT se preguntó a cada uno de los capitanes de cada uno de los buques muestreados. Después del muestreo, los hisopos se sumergieron en frascos de cultivo

(Greiner Bio-One Inc., Longwood NJ, EE.UU.), que contenían 20 mL de medio F/2 (Sigma Aldrich) y se almacenaron a 15 °C en oscuridad hasta que se procedió a la identificación de las microalgas en el laboratorio. Este período nunca excedió de 24 horas después de la recogida de la muestra.

Controles

Paralelamente a la recogida de las muestras de los barcos procedentes de los viajes transoceánicos, se tomaron muestras control de las poblaciones de fitoplancton autóctono. De este modo, se muestreó no solo la columna de agua sino, también, la película de bioensuciamiento o *biofouling* del casco de algunos buques de base local, más concretamente, de dos remolcadores localizados en cada uno de los puertos mencionados y haciéndolo de la misma forma anteriormente descrita. En el caso de la columna de agua se recogieron 250 mL con una red de fitoplancton de 5 µm. Todas las muestras fueron almacenadas a 15 °C en oscuridad hasta que se procedió a la identificación de las microalgas en el laboratorio, lo que se hizo, igualmente, en un intervalo de tiempo inferior a las 24 horas desde el momento de la recolección.

El fitoplancton se identificó microscópicamente en muestras frescas y, también, en muestras fijadas con formalina al 4% utilizando un microscopio invertido (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Alemania), utilizando la magnificación de 200x y 400x para distinguir entre clases y de 600x para identificar especies.

5.3.7. Experimento de biorremediación empleando los mutantes resistentes obtenidos en el análisis de fluctuación frente al hexaclorociclohexano (lindano)

La experimentación relativa a esta sección tenía como objetivo poder determinar si los mutantes resistentes obtenidos en los análisis de fluctuación eran capaces de permitir la biorremediación de lindano. Para ello se seleccionaron tres cultivos procedentes de dichos análisis en dónde se observaba crecimiento de células resistentes, y así poder utilizarlos para inocular los correspondientes ensayos. Como se ha indicado anteriormente, el lindano es insoluble en agua, por lo que inicialmente se preparó una solución madre de lindano utilizando etanol como disolvente y añadiendo, después, a cada cultivo pequeñas alícuotas de ésta para así poder alcanzar las concentraciones

finales deseadas de dicho agente contaminante, concretamente se utilizaron (5, 15 y 40 mg/L) pero sin que nunca se superara con el etanol añadido más del 0,5 % del volumen total.

Para ello, se dispusieron tres tubos estériles introduciendo en cada uno de ellos 5 mL de medio de cultivo esterilizado BG11 que contenía, respectivamente, las tres concentraciones de lindano indicadas, los cuales se inocularon con $1 \cdot 10^5$ células. Adicionalmente, también se siguió de forma paralela la eliminación del lindano por métodos abióticos, es decir manteniendo el contaminante las mismas condiciones pero en tubos sin inoculación de células; dichos ensayos fueron los correspondientes controles y, lógicamente, fueron preparados con los mismos valores de concentración. Los cultivos y los controles se mantuvieron a 20 °C bajo luz continua de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR en la superficie de los recipientes de cultivo durante 60 días para permitir el crecimiento celular y, con ello la posible eliminación del lindano por biorremediación.

Determinación del lindano

La concentración de lindano en todos los tubos se midió por medio de cromatografía de gases con detección por captura de electrones (GC-ECD). El protocolo seguido para ello fue el siguiente: el volumen total de cada cultivo se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio de 25 mm de diámetro, para, posteriormente, analizar las dos fases, tanto la solución líquida filtrada como la fase sólida retenida en el filtro. De forma previa a la realización del análisis, del volumen total de cada muestra líquida, o del correspondiente sólido retenido en el filtro, se extrajo el lindano con diclorometano concentrándose después la solución extractante resultante a un volumen final de 1 mL. Posteriormente, una alícuota de 1 μL era la que se inyectaba en el cromatógrafo de gases (GC) Agilent 6890N equipado con un detector de captura de electrones (EDC), utilizando una columna capilar DB-5 de sílice fundida (30 m x 0,25 mm x 0,3 μm de espesor). La inyección tuvo lugar a una temperatura de 275 °C. La tasa del flujo del gas portador (nitrógeno) fue de 1,5 mL min^{-1} .

El lindano fue identificado midiendo su tiempo de retención cromatográfica ($12,31 \pm 0,2$ min) y comparándolo con el correspondiente a una muestra de lindano estándar. En concreto la concentración de lindano de cada muestra se calculó

comparando el área total de cada pico detectado en el análisis de cada una de las muestras con el área total del correspondiente pico del pesticida estándar. La fiabilidad y la precisión de todas las mediciones fueron establecidos de acuerdo a las Normas del British Standards Institute (BSI, 1979) y Thrusfield (1995).



6. RESULTADOS

CAPÍTULO I

Determinación de las fuerzas evolutivas implicadas en la adaptación al cambio global

La situación que, para muchos autores, está viviendo actualmente nuestro planeta con el cambio global podría ser, también, una época de cambios muy drásticos (Wolfe *et al.*, 2013). No obstante, salvo incrementos extremos en los niveles de los gases efecto invernadero, que provocaran en la Tierra condiciones límite, muchos organismos del fitoplancton podrían mantenerse con vida. Es por ello que la comprensión de las distintas respuestas biológicas de los organismos fitoplanctónicos ante el cambio global es uno de los retos más importantes a los que se enfrentará el campo de la biología evolutiva en las próximas décadas (Bell & Collins, 2008).

Debido a los problemas que las floraciones de algas tóxicas han causado, causan y causarán en la salud, tanto de las personas como de los animales y, también, a las graves pérdidas económicas que generan este tipo de episodios (Hoagland *et al.*, 2002), es de vital trascendencia contribuir al estudio de la importancia relativa de las diferentes fuerzas evolutivas involucradas en el desarrollo de las características actuales de las poblaciones implicadas en floraciones masivas; todo ello tomando como referencia el escenario de cambio global en el que está inmerso el planeta ya que, recientemente, se ha relacionado la expansión de estos episodios con el cambio climático global antropogénico (Hallegraeff, 2009).

En relación con este fenómeno, se debe tener en cuenta el aumento exponencial en los dos últimos siglos de la concentración atmosférica en CO₂ y en otros importantes gases con efecto invernadero, según los datos aportados en los Informes de Síntesis elaborados por el IPCC (Panel Intergubernamental para el Cambio climático) y, especialmente, el V informe correspondiente al Grupo de Trabajo I publicado en Septiembre de 2013; de los que se deriva una inevitable acidificación del medio acuático y un aumento de la temperatura en la superficie del mar. Estas alteraciones medioambientales suponen que todos los organismos marinos, incluidas las especies implicadas en estas floraciones tóxicas, estén siendo expuestos a cambios impredecibles

y, además, producidos de una forma mucho más rápida e intensa que en su pasado evolutivo (Raven *et al.*, 2005; Rost *et al.*, 2008). Por esta razón, muchos investigadores han planteado la necesidad de realizar experimentos de selección a largo plazo, con el fin de entender el potencial de adaptación y la evolución resultante del cambio global en los océanos (Raven *et al.*, 2005).

Con **este primer capítulo** se ha abordado **el primer objetivo** planteado en la tesis: El hecho de dilucidar el peso o importancia de las distintas fuerzas evolutivas implicadas en la adaptación del fitoplancton. Por lo tanto, se planteó la posibilidad de, una vez superada la barrera de la aclimatación fisiológica, evaluar la contribución de la adaptación a determinados agentes adversos de efecto selectivo, basada en la selección de aquellos mutantes capaces de resistir a las nuevas condiciones; no obstante, también, se tuvo presente el rol de otros factores como el azar y la historia en el cambio fenotípico de dos cepas del dinoflegelado *A. minutum*, frecuentemente responsable de la formación de floraciones masivas.

Más concretamente, se estudió la evolución de dos factores implicados en la aparición y desarrollo de las mareas rojas: 1) la tasa de crecimiento celular y 2) la producción de toxina por célula. Para este propósito, se realizó el procedimiento experimental, a largo plazo, adaptado a las microalgas de Lensky denominado de “poblaciones ancestrales frente a poblaciones derivadas”, basado en las aportaciones de Trivisano y colaboradores (Trivisano *et al.*, 1995). Se trabajó con una serie de cultivos previamente aclimatados a un valor de pH de 8,0 y a una temperatura de 20 °C, los cuales fueron sometidos a un incremento de temperatura de 5 °C y a una disminución del valor de pH en 0,5 unidades, simulando, de este modo, unas condiciones más extremas producidas por el cambio global. Se tenía como objetivo poder, así, evaluar cuantitativamente las diferencias existentes, entre las poblaciones ancestrales y las derivadas, en los valores obtenidos de tasa de crecimiento y producción de toxina. Estos resultados han permitido plantear la hipótesis de que el número de floraciones masivas tóxicas en las próximas décadas es muy previsible que se vea incrementado en relación a la frecuencia con la que ocurren actualmente. Sin embargo, se hizo más difícil avanzar predicciones acerca de la posible toxicidad que acarrearán este tipo de fenómenos.

- Effects of adaptation, chance and history on the evolution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* under selection of increased temperature and acidification

Ecology and Evolution, 2 (2012) 1251-1259

doi: 10.1002/ece3.198

Effects of adaptation, chance, and history on the evolution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* under selection of increased temperature and acidification

Antonio Flores-Moya¹, Mónica Rouco², María Jesús García-Sánchez¹, Camino García-Balboa², Raquel González², Eduardo Costas² & Victoria López-Rodas²

¹Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

²Departamento de Producción Animal (Genética), Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

Keywords

Adaptation, *Alexandrium minutum*, chance, historical contingency, toxic red tides.

Correspondence

Antonio Flores-Moya, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain.
Tel: +34 952 131 951; Fax: +34 952 131 944;
E-mail: floresa@uma.es

Financially supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation by the grant CGL2008-00652/BOS, and Junta de Andalucía Research Group RNM-115.

Received: 29 November 2011; Accepted: 1 December 2011

Ecology and Evolution 2012; 2(6): 1251–1259

doi: 10.1002/ece3.198

Abstract

The roles of adaptation, chance, and history on evolution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim, under selective conditions simulating global change, have been addressed. Two toxic strains (AL1V and AL2V), previously acclimated for two years at pH 8.0 and 20°C, were transferred to selective conditions: pH 7.5 to simulate acidification and 25°C. Cultures under selective conditions were propagated until growth rate and toxin cell quota achieved an invariant mean value at 720 days (ca. 250 and ca. 180 generations for strains AL1V and AL2V, respectively). Historical contingencies strongly constrained the evolution of growth rate and toxin cell quota, but the forces involved in the evolution were not the same for both traits. Growth rate was 1.5–1.6 times higher than the one measured in ancestral conditions. Genetic adaptation explained two-thirds of total adaptation while one-third was a consequence of physiological adaptation. On the other hand, the evolution of toxin cell quota showed a pattern attributable to neutral mutations because the final variances were significantly higher than those measured at the start of the experiment. It has been hypothesized that harmful algal blooms will increase under the future scenario of global change. Although this study might be considered an oversimplification of the reality, it can be hypothesized that toxic blooms will increase but no predictions can be advanced about toxicity.

Introduction

Although genetic adaptation, as a consequence of natural selection, is considered the main force driving evolution, two other factors also contribute to evolutionary change: chance and historical contingency (Gould 2002). The effects of chance are usually due to genetic drift events and random mutations without value for the organisms (Crow and Kimura 1970; Kimura 1983; Spiess 1989); the final consequence is that alleles that neither improve nor decrease adaptation are maintained in populations. Historical contingency can become important if certain genetic changes of adaptive value in the past constrain or promote evolutionary outcomes (Gould and Lewontin 1979; Blount et al. 2008). To disentangle the effects of adaptation, chance, and history on

evolutionary change, Gould (1989, pp. 320–321) proposed a theoretical experiment, which consisted of “replaying life’s tape” to test the repeatability of evolution and thereby to evaluate their respective roles; the experiment was envisioned to demonstrate the processes involved in macroevolutionary events. Obviously, an experiment such as that envisioned by Gould (1989) cannot be performed, as Lenski and Travisano (1994) stated: “the limitations reflect our lack of access to better machines for time travel.” However, this theoretical experiment can be empirically addressed in microevolution by the robust experiment of Travisano et al. (1995) in which, instead of “replaying life’s tape” sequentially (where each tape recording is a replication of the experiment, each of them separated in time), one can achieve the same objective by replicating independent isolates propagated simultaneously.

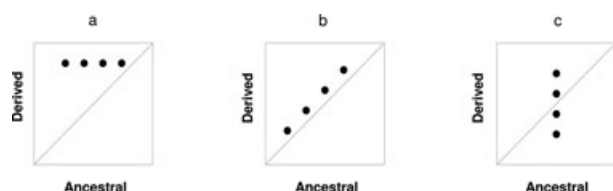


Figure 1. Schematic representation of evolutionary change determined by adaptation (a), history (b), and chance (c). The effects of chance are demonstrated for a set of clones of a single ancestral genotype, whereas adaptation and history are illustrated for several independent ancestors. Isoclines (dotted line) represent the score location if no changes take place. Adapted from Travisano et al. (1995) and Waagenar and Adami (2004).

At the starting point, identical isolates (replicates) from a single ancestral genotype are established and the initial mean value of a specific phenotypic trait (in our case, growth rate and toxin cell quota) is measured for each of them. This value is expected to be identical among strains, within statistical limits of measurement error, at the beginning of the experiment. After a period of time, the value of each trait is measured again for each isolate. Differences between the initial and final mean values are explained as a result of the effect of adaptation, chance, or history (Fig. 1). Thus, a significant change in the mean value in relation to that of the ancestral isolate means that the trait has been a target of natural selection or that it is correlated with some other trait that has been selected. On the other hand, a significant increase in its variance represents the occurrence of divergence among the evolved isolates (the specific trait has not been a target for adaptation but reflects the effects of random mutations or drift or their interactions with other evolutionary processes). Other alternatives are the occurrence of both adaptation and chance, or on the other hand, the occurrence of neither.

To test the effect of history, it is necessary to carry out a similar experiment using different ancestral genotypes (Travisano et al. 1995; Fig. 1). The experiment of Travisano et al. (1995) was designed for bacterial populations, and with the appropriate modifications it has been recently addressed with digital organisms (Wagenaar and Adami 2004) in an apicomplexan parasite (Pérez-Zaballos et al. 2005), a marine dinoflagellate (Flores-Moya et al. 2008), and cyanobacterium (Rouco et al. 2011). Certainly, this experimental evolutionary study can be carried out in any microorganism that can be asexually grown and easily manipulated during many generations.

Blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim were previously known only from the waters of the Mediterranean Sea and South Australia (Hallegraeff et al. 1988) but toxic populations have been later detected in northern France (Belin 1993), northwestern Spain (Franco et al. 1994), the North Sea (Nehring 1998; Elbrachter 1999; Persson et al. 2000; Hansen et al. 2003), India (Godhe et al. 2001), Malaysia (Usup et al. 2002), Vietnam (Yoshida et al.

2000), and South Africa (Pitcher et al. 2007). The increase in reports of harmful algal blooms has been related to increased numbers of scientific studies (Anderson 1989), eutrophication or unusual climatic conditions in coastal waters (Hallegraeff 1993), and to the spread of toxic algae by natural (Vila et al. 2001; Persich et al. 2003) or human-assisted vectors (Lilly et al. 2002; Fahnenstiel et al. 2009). More recently, the factors linked to anthropogenic global change have also been implicated in the expansion of harmful algal blooms (Hallegraeff 2009). In relation to global change, it must be taken into account that the increasing CO₂ concentration in the last two centuries (and the concomitant acidification and increased temperature at the sea surface) means that *A. minutum* (and all marine organisms) are being exposed to changes that are taking place faster than those that they underwent in their evolutionary past (Raven et al. 2005; Rost et al. 2008). However, few phytoplankton experiments have gone on long enough for genotype selection to be significant (Reboud and Bell 1996; Collins and Bell 2004; Collins et al. 2006; Flores-Moya et al. 2008; Rouco et al. 2011). For this reason, it has been suggested that long-term selection experiments must be performed in order to understand the potential adaptation and evolution resulting from global change in the oceans (Raven et al. 2005).

The aim of this work was to evaluate the contribution of adaptation (separating acclimation from selection of favored mutants), chance, and history to the phenotypic change in growth rate and toxin cell quota in two toxic strains of *A. minutum*. For this purpose, long-term cultures (previously acclimated to pH 8.0 and 20°C) were performed at a temperature increased by 5°C and a pH drop of 0.5 units; then, the ancestral and derived scores of growth rate and toxin cell quota were compared. Although the experimental approach followed here is an oversimplification of the reality, it constitutes a novel way to explore the evolutionary response of toxic dinoflagellates to anthropogenic-induced changes in environmental conditions.

Materials and Methods

Experimental organism and growth conditions

Two strains of *A. minutum* Halim (both isolated from the Ría de Vigo, NW Spain), one of which (Al1V) is more toxic than the other (Al2V; Flynn et al. 1994), were used. The strains are available from the Algal Culture Collection of the Facultad de Veterinaria (Universidad Complutense, Madrid, Spain). Cultures of both strains were maintained in 50-mL Greiner tissue-culture flasks in 20-mL f/2 medium supplied by Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Germany) at 20°C, pH 8.0 under 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm, 16:8 h light:dark photoperiod. Exponential growth of cells was achieved by serial transfer of an inoculum to fresh medium every 21 days, for two years (Fig. 2).

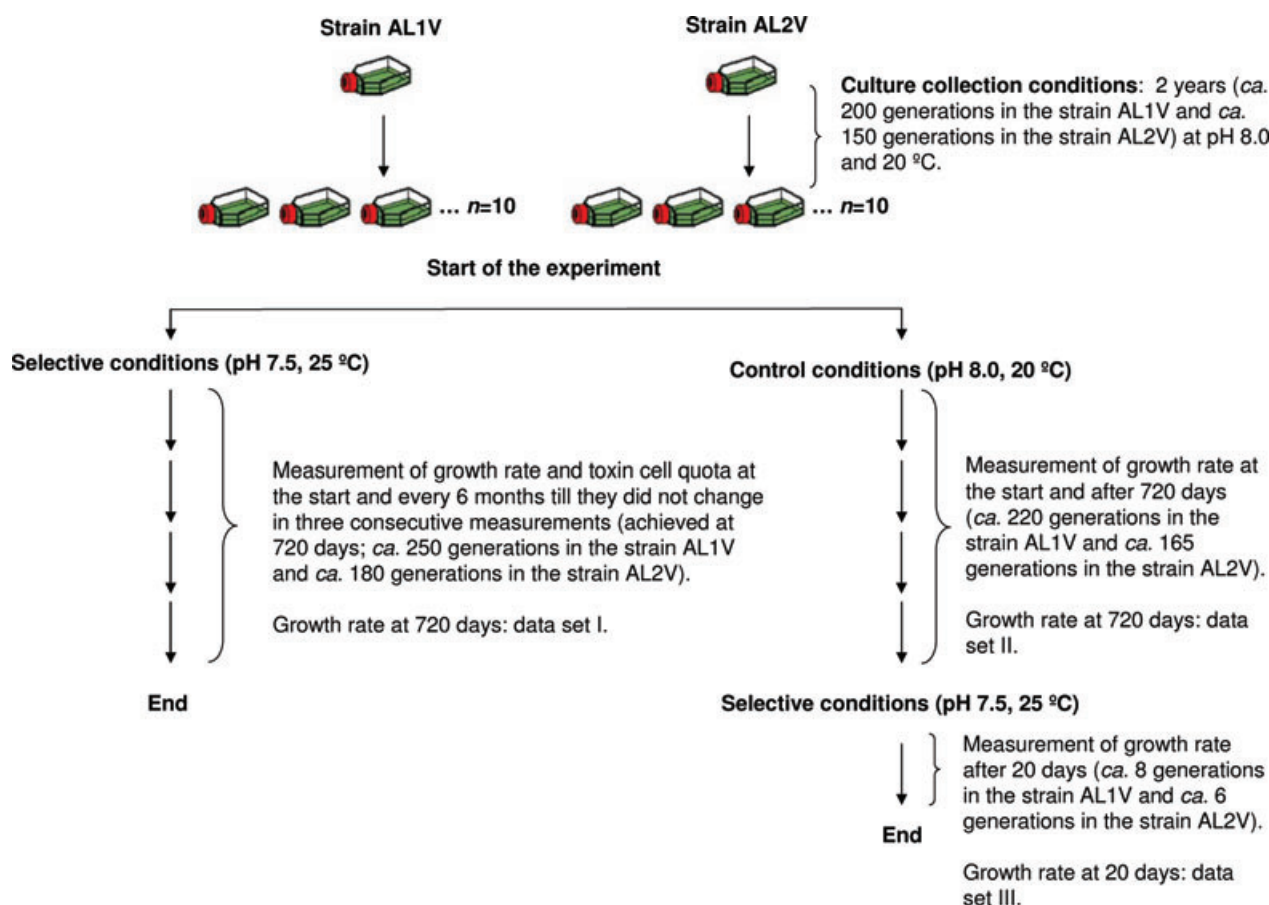


Figure 2. Schematic representation of the experimental design. Ten isolates for control (pH 8.0, 20°C) and 10 for selective conditions (pH 7.5, 25°C) of each *Alexandrium minutum* strain (AL1V and AL2V) were maintained through serial transfer into fresh medium. Under selective conditions, growth rate and toxin cell quota were determined every six months till these traits did not change in three consecutive measurements (720 days, corresponding to ca. 250 generations in strain AL1V and ca. 180 generations in strain AL2V). In order to disentangle the effects of acclimation from genetic adaptation, additional growth rate measurements were made in the controls after ca. 220 generations in strain AL1V and ca. 165 generations in strain AL2V. For this purpose, the control cultures were transferred to selective conditions (pH 7.5, 25°C) for 20 days (corresponding to ca. eight generations in strain AL1V and ca. six generations in strain AL2V).

More data on isolation, culture, and genetics of these strains are compiled in Costas and López-Rodas (1994, 1996), Costas *et al.* (1995), and Mendoza *et al.* (1995). The absence of viable bacteria was tested periodically by epifluorescence microscopy after staining with acridine orange.

Experimental design

Just before the experiment, both strains were recloned from a single vegetative cell, thus assuring their genetic homogeneity at the starting point. These newly established cultures were grown to mass populations in environmental conditions similar to those used to maintain cultures started from stocks from the Algal Culture Collection two years before (*f/2* medium, 20°C, pH 8.0 under 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm, 16:8 h light:dark

photoperiod). Cultures were then used to found 10 independent populations of each strain, and their growth rates and toxin cell quota were measured (Fig. 2). These populations were transferred to new culture conditions that were chosen in order to mimic the proposed environmental conditions in the middle latitude oceans for the next few decades. For this purpose, only two of the principal environmental factors involved in global changes in the oceans were chosen: temperature and pH. Studies on global change predict a warming of 2–6°C (Hansen *et al.* 2000; IPCC 2007) and a pH drop in the sea surface of 0.2–0.5 units (Zeebe and Wolf-Gladrow 2001; Caldeira and Wickett 2003) below today's mean, by 2100–2200. Consequently, the cultures were transferred to 25°C and pH 7.5 but the other culture conditions (*f/2* medium, 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm, 16:8 h light:dark photoperiod) were

maintained as previously described. To reduce the pH to 7.5, 1N HCl was added to the culture medium. Because the pH increased to 8.0 in 8–10 days due to the photosynthetic activity of cells, the pH was adjusted every three days (at this moment, pH ranged from 7.5 to 7.7).

Experimental cultures were serially propagated by 32-fold dilution into fresh medium every 18–12 days for strain AL1V and 25–17 days for strain AL2V (this interval was shortened as the experiment progressed), in order to achieve ca. 5 generations of binary division before the further addition of fresh medium. At every transfer, the population size was ca. 2.5×10^3 cells. Growth rate and toxin cell quota, averaged for each strain, were checked every six months. Cultures were propagated until no significant changes in growth rate and toxin cell quota (tested by one-way analysis of variance [ANOVA]) were detected in three consecutive measurements (after 720 days, corresponding to ca. 250 and ca. 180 generations for strains AL1V and AL2V, respectively). Then, averaged growth rate and toxin cell quota of the evolved populations were newly measured (Fig. 2). Under all of the culture conditions used in the experiment, proliferation of cells was exclusively due to asexual reproduction.

The effects of adaptation, history, and chance on evolutionary change of growth rate and toxin cell quota were estimated by using the values measured at the start and at the end of the experiment (see Fig. 1). The effects of adaptation were defined by changes in the great mean value and 95% confidence limits were calculated by using the *t* distribution. The effects of history and chance were estimated by means of a two-level (two strains and 10 isolates within each strain, with three replicates of the growth rate or toxin cell quota measurement per isolate) nested ANOVA. Thus, the contribution of the history component corresponds to the variance measured among strains, whereas the chance component was estimated by the variance measured among isolates within the same strain. The homogeneity of variances was checked with the Bartlett test. The square root of the variance component for history and chance was reported in order to use units that were comparable to the mean change due to adaptation. Approximate 95% asymmetrical confidence limits were calculated for the variance components. All the tests were performed according to Zar (1999).

Acclimation versus genetic adaptation

In order to test whether adaptation resulted from acclimation or by selection of new genetic variants arising by mutations, the cells cultured in the control conditions (10 isolates from both strains, propagated for 720 days) were then transferred to the selective culture conditions (pH 7.5, 25°C) for 20 days (ca. eight generations in strain AL1V and ca. six generations in strain AL2V; Fig. 2). It must be highlighted that almost in bacteria, seven generations are enough to check if

adaptation process is assured by means of acclimation or genetic mechanisms (Cooper 1991).

Genetic adaptation corresponds to the difference between growth rate of the derived cells under selective conditions and growth rate of the derived cells under control conditions and transferred for 20 days to selective conditions (i.e., growth rate data sets I–III in Fig. 2). Acclimation corresponds to any excess of the growth rate of the later in comparison to growth rate from the derived control cells (i.e., growth rate data sets III–II in Fig. 2).

Measurement of growth rate and toxin cell quota

Growth rate was measured under *r*-selection conditions in exponentially growing cultures according to Crow and Kimura (1970) as

$$\text{Growth rate} = \log_e (N_t / N_0) / t,$$

where N_t and N_0 are the cell number at time $t = 5$ and 0 day, respectively. The values of N_0 and N_t were determined at 6 and 11 days after the transfer of cells to fresh medium. Three independent observers made cell counts by haemocytometer (Double Neubauer, ruling, Fortuna W. G. Co., Germany), obtaining a CV <5% on the same sample.

Toxin was measured using the Ridascreen[®] Fast PSP SC competitive enzyme immunoassay (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) according to the instructions of the manufacturer. Toxin cell quota was computed as toxin content measured in the sample divided by the number of cells (measured by haemocytometer). Five pseudoreplicates on the same sample yielded a CV <3%.

Results

Growth rate

Ancestral and derived scores of growth rate in the two strains of *A. minutum* are shown in Fig. 3a. Adaptation was absent (by design) at the start of the experimental selective period but the initial scores of growth rate of *A. minutum* were significantly affected by history ($F = 162.14$; $df = 1$ and 18; $P < 0.05$) and, in a lower quantity, by chance ($F = 4.94$; $df = 18$ and 40; $P < 0.05$; Fig. 3b).

After ca. 250 generations in strain AL1V and ca. 180 generations in strain AL2V under selective conditions, ca. 20% of the evolutionary change was explained as adaptation ($t = 25.461$; $df = 58$; $P < 0.05$), ca. 75% was due to history ($F = 342.83$; $df = 1$ and 18; $P < 0.05$) and ca. 5% was a consequence of chance ($F = 7.95$; $df = 18$ and 40; $P < 0.05$; Fig. 3b). It must be highlighted that 95% upper confidence limits for both initial and final effects of history (i.e., the variance among strains) are very high because only two strains were used.

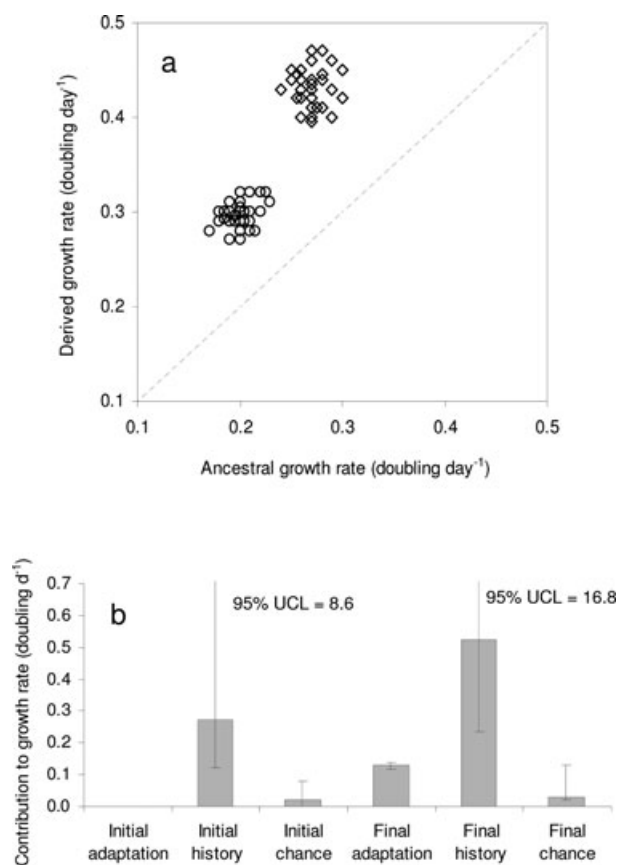


Figure 3. (a) Ancestral versus derived values for mean growth rate measurements in 10 isolates from strains AL1V (diamonds) and AL2V (circles) of *Alexandrium minutum*. Derived values were obtained after 720 days (ca. 250 and ca. 180 generations in strains AL1V and AL2V, respectively). Isocline (dotted line) represents the score location if no changes take place. (b) Contributions of adaptation, chance, and history to growth rate at the start and at the end of the experiment. Error bars represent 95% confidence limits; values of the upper confidence limits (UCL) for history are included.

In order to disentangle genetic adaptation and acclimation as components of final adaptation, the growth rates corresponding to data sets I–III were used (see Fig. 2). Mean growth rates in the controls at pH 8.0 and 20°C at the outset of the experiment (data set II), were 0.27 ± 0.02 and 0.20 ± 0.01 doubling day⁻¹ for the strains AL1V and AL2V, respectively. However, the growth rates from both strains significantly increased (t -test = 28.361 and 31.563 for strains AL1V and AL2V, respectively; $df = 18$; $P < 0.05$) when they were transferred for 20 days under selective conditions (data set III), yielding an overall mean value of 0.32 ± 0.02 and 0.23 ± 0.02 doubling day⁻¹ for the strains AL1V and AL2V, respectively. These later values were significantly lower (t -test = 38.075 and 42.783 for strains AL1V and AL2V, respectively; $df = 18$; $P < 0.05$) than those found at the end of the experiment in the derived cells (0.43 ± 0.02 and 0.30 ± 0.02

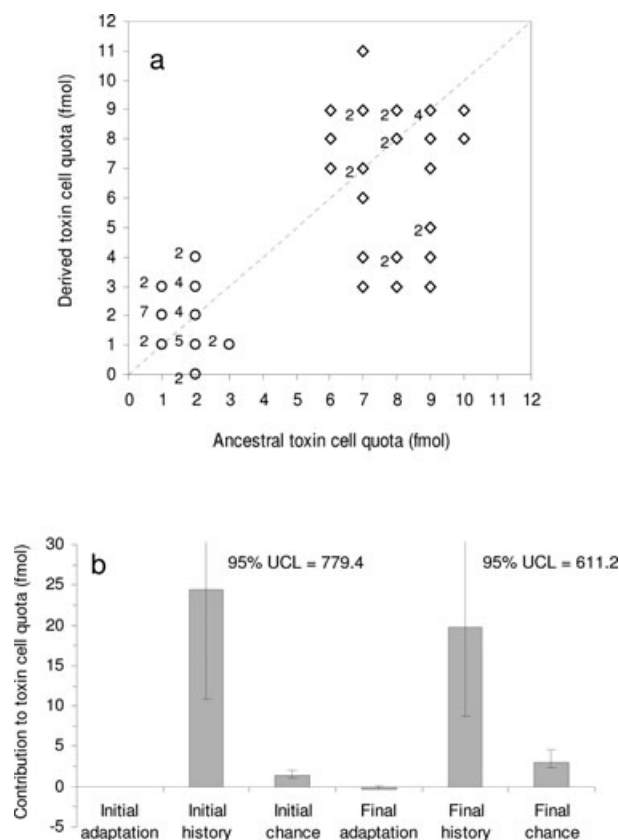


Figure 4. (a) Ancestral versus derived values for mean toxin cell quota measurements in 10 isolates from the strains AL1V (diamonds) and AL2V (circles) of *Alexandrium minutum*. Derived values were obtained after 720 days (ca. 250 and ca. 180 generations in strains AL1V and AL2V, respectively). Digits close to symbols indicate the number of similar scores. Isocline (dotted line) represents the score location if no changes take place. (b) Contributions of adaptation, chance, and history to toxin cell quota at the start and at the end of the experiment. Error bars represent 95% confidence limits; values of the upper confidence limits (UCL) for history are included.

for strains AL1V and AL2V, respectively; data set I). From the differences between the growth rate data sets, it was found that acclimation (data sets III–II) accounted ca. 32% of total adaptation, while the selection (data sets I–III) of new genetic variants was responsible for the rest ca. 68%.

Toxin cell quota

The scores of ancestral and derived toxin cell quota in strains AL1V and AL2V are shown in Figure 4a. Both history and chance significantly contributed to the initial scores of toxin cell quota of both strains of *A. minutum* ($F = 325.07$, $df = 1$ and 18, $P < 0.05$ for history; $F = 4.78$, $df = 18$ and 40, $P < 0.05$ for chance; Fig. 4b).

The evolutionary change of toxin cell quota of *A. minutum* after ca. 250 generations in strain AL1V and ca. 180 generations in strain AL2V under the new conditions was not a

consequence of adaptation ($|t| = 1.463$, $df = 58$, $P = 0.14$). However, the evolutionary change was significantly affected by both the historical contingency ($F = 41.96$; $df = 1$ and 18 ; $P < 0.05$) and the chance ($F = 21.46$, $df = 18$ and 40 , $P < 0.05$; Fig. 4b).

Discussion

Understanding the biological responses to global change will be one of the main tasks of evolutionary biology in coming decades (Bell and Collins 2008). Due to the implications for human health risks and economic losses caused by toxic algae (Hoagland et al. 2002), the assessment of the relative importance of the different components of evolution elicited by environmental forcing is crucial. The predictions about the growth rate and performance of microalgae at the prevailing conditions in seawater by 2100–2200 are based mostly on short-term experiments and they differ between species and taxonomic groups (Beardall and Raven 2004). For instance, it is known by short-term experiments that *A. minutum* shows higher growth rates at pH 7.5 than at pH 8.5, and 25°C seems to be an optimal environmental condition for cell growth in this species (Hwang and Lu 2000). However, the increment in growth rates found in our long-term experiments at pH 7.5 and 25°C is higher than the increment observed in short-term experiments at different pH values (Hwang and Lu 2000). Moreover, the increased growth rates in our experiment were mainly due to the selection of new genetic variants arising by mutation. This results point to the fact that long-term selection experiments are needed to understand the potential adaptation and evolution resulting from global change in the marine environment.

The evolution of growth rate in both strains of *A. minutum* was strongly constrained by the historical contingencies although adaptation was also involved. Genetic adaptation (i.e., selection of favored mutants) accounted two-thirds of total adaptation while one-third was due to acclimation. The selective effect of the increased temperature and slight drop in pH seemed to be strong enough to constrain the adaptation of all the experimental replicates in both strains, as suggested by the negligible contribution of chance. Since asexually growing clonal cultures were used, the evolutionary changes are due to new mutations, which occurred during propagation of derived cultures under the new environmental conditions. There should be a high number of mutants due to the huge number of cells growing in each culture. Some mutations increased growth rate and were selected, displacing the wild-type genotypes. Mutations decreasing growth rate were eliminated by natural selection.

The strong contribution of history suggests that disruptive selection could operate in *A. minutum*, because differences in mean growth rate scores between the strains increased under the selective conditions. The metaphor of the adaptive

landscape (Wright 1932; Whitlock et al. 1995; Colegrave and Buckling 2005) could be applied to explain the different final growth rate scores between strains AL1V and ALV2: natural selection drove the strains to different final adaptive peaks differing in height. However, the disruptive selection pattern for the evolution of growth rate of *A. minutum* differs from the one found in other biological models in which directional selection (i.e., the convergence of the growth rate of experimental isolates) was the pattern found in viruses (Bull et al. 1997; Cuevas et al. 2002), bacteria (Travisano et al. 1995), protozoa (Pérez-Zaballos et al. 2005), the dinoflagellate *Prorocentrum triestinum* Schiller (Flores-Moya et al. 2008), the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (Rouco et al. 2011) and even digital organisms (Wagenaar and Adami 2004; in this case, award rate, a variable closely related to average growth rate, was used).

The phenotypic changes in toxin cell quota were due to chance but, as it occurred with evolution of the growth rate, they were strongly constrained by historical contingency. According to evolutionary theory, chance includes random genetic drift (Crow and Kimura 1970) and neutral mutations (Kimura 1983). Genetic drift events are a consequence of “sampling errors” when the number of individuals in populations becomes relatively low at a given moment (Crow and Kimura 1970); because the minimum cell density of *A. minutum* in the cultures was ca. 2.5×10^3 cells in 20 mL of culture medium, it can be hypothesized that the role of chance may be due to neutral mutations rather than to genetic drift events. Since each culture has a huge number of cells, numerous mutations should have arisen during cell growth in each isolate. Some mutations increased toxin production whereas other mutations decreased toxin production, suggesting that the effect of selection for toxin production in derived population was neutral. Thus, neither toxin-increased nor toxin-decreased mutants have selective advantage. Moreover, it could be supposed that wild-type ancestral genotypes have no selective advantage. Consequently, natural selection was not strong enough to constrain the evolution of toxin production in the experimental isolates. So, the effect of history was maintained during evolution of toxin production under new environmental conditions.

Abiotic factors such as temperature, salinity, and inorganic nutrient availability (Anderson et al. 1990) have a clear effect on both toxin production and growth rate in dinoflagellates (Boyer et al. 1987; Ogata et al. 1987; Anderson et al. 1990; Parkhill and Cembella 1999). However, growth rate and toxin production are not usually correlated in dinoflagellates. For instance, Guisande et al. (2002) found that growth rate and toxin production were not associated in *A. minutum*. The reason for the lack of relationship between growth rate and toxin production could be due to the toxin synthesis that is not a constitutive component of algal metabolism; they are synthesized from low molecular weight metabolites while cell

growth is a much more complex process. At present, it is not yet clear why some marine dinoflagellate produce toxins and the possible adaptive advantages. The evolutionary approach followed in this work could be useful to clarify the possible adaptive value of toxins in dinoflagellates. It is well established in evolutionary theory that traits that are strongly correlated with fitness (such as growth rate) evolve by adaptation (selection of favorable mutations) whereas traits that are not (or are very weakly) correlated with fitness evolve by chance (Kimura 1983; Spiess 1989). In fact, these were results found in the study and, consequently, it could be hypothesized that toxicity in *A. minutum* had no adaptive value. Chance could also explain the transformation of a daughter line of a single parental culture of the toxic strain 18-1T from *A. minutum* (sub *Alexandrium lusitanicum* Balech), to the nontoxic phenotype, then renamed strain 18-INT (Martins *et al.* 2004). The toxic strain was isolated in 1962; in 1992, a subculture was sent to a different laboratory. It was found that the loss of toxicity occurred between 1995 and 2000 and it was argued that it could be due to genetic mutations or the effects of prolonged treatment of the nontoxic strain with antibiotics (Martins *et al.* 2004). Although the role of antibiotics cannot be rejected, the hypothesis of the role of neutral mutations in the loss of toxicity seems to be more plausible.

Taken together the results from the changes in growth rate and toxin cell quota under a scenario of global change of increased temperature and a pH drop of 0.5 units, it could be hypothesized that red tides of toxic *A. minutum* could increase but the toxicity of the cells may be unpredictable. Of course, the present study is an oversimplification of reality but it is a novel way to explore one of the main deficits in our knowledge of the long-term evolution of toxic algae. In order to add more knowledge on the future performance of toxic algae, more studies including other ecological factors involved in global change must be addressed.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation by the grant CGL2008–00652/BOS, and Junta de Andalucía Research Group RNM–115. E. C. Henry kindly revised the English style and usage. The suggestions and critical reading by S. Collins are deeply acknowledged.

References

- Anderson, D. M. 1989. Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. Pp. 11–16 in T. Okaichi, D. M. Anderson, T. Nemoto, eds. *Red tides: biology, environmental science, and toxicology*. Elsevier, New York, NY.
- Anderson, D. M., D. M. Kullis, J. J. Sullivan, S. Hall, and C. Lee. 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. *Mar. Biol.* 104:511–524.
- Beardall, J., and J. A. Raven. 2004. The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia* 43:26–40.
- Belin, C. 1993. Distribution of *Dinophysis* spp. and *Alexandrium minutum* along French coasts since 1984 and their DSP and PSP toxicity levels. Pp. 469–474 in T. J. Smayda, Y. Shimizu, eds. *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Bell, G., and S. Collins. 2008. Adaptation, extinction and global change. *Evol. Appl.* 1:3–16.
- Blount, Z. D., C. Z. Borland, and R. E. Lenski. 2008. Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:7899–7906.
- Boyer, G. L., J. J. Sullivan, R. J. Andersen, P. J. Harrison, and F. J. R. Taylor. 1987. Effects of nutrient limitation on toxic production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* 96:123–128.
- Bull, J. J., M. R. Badgett, H. A. Whicman, J. P. Huelsenbeck, D. M. Hillis, A. Gulati, C. Ho, and I. J. Molineaux. 1997. Exceptional convergent evolution in a virus. *Genetics* 147:1497–1507.
- Caldeira, K., and M. E. Wickett. 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425:325.
- Colegrave, N., and A. Buckling. 2005. Microbial experiments on adaptive landscapes. *BioEssays* 27:1167–1173.
- Collins, S., and G. Bell. 2004. Phenotypic consequences of 1,000 generations of selection at elevated CO₂ in a green alga. *Nature* 431:566–569.
- Collins, S., D. Sültemeyer, and G. Bell. 2006. Rewinding the tape: selection of algae adapted to high CO₂ at current and Pleistocene levels of CO₂. *Evolution* 60:1392–1401.
- Cooper, S. 1991. Bacterial growth and division. *Biochemistry and regulation of prokaryotic and eukaryotic division cycles*. Academic, San Diego, CA.
- Costas, E., and V. López-Rodas. 1994. Identification of marine dinoflagellates using fluorescent lectins. *J. Phycol.* 30:987–990.
- Costas, E., and V. López-Rodas. 1996. Enumeration and separation of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* from natural samples using immunological procedures with blocking antibodies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 198:81–87.
- Costas, E., R. Zardoya, J. Bautista, A. Garrido, C. Rojo, and V. López-Rodas. 1995. Morphospecies vs. genospecies in toxic marine dinoflagellates: an analysis of *Gymnodinium catenatum*/*Gyrodinium impudicum* and *Alexandrium minutum*/*A. lusitanicum* using antibodies, lectins, and gene sequences. *J. Phycol.* 31:801–807.
- Crow, J. S., and M. Kimura. 1970. An introduction to population genetics theory. Harper and Row, New York, NY.
- Cuevas, J. M., S. F. Elena, and A. Moya. 2002. Molecular basis of adaptive convergence in experimental populations of RNA viruses. *Genetics* 162:533–542.
- Elbrachter, M. 1999. Exotic flagellates of coastal North Sea waters. *Helgolander Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 52:235–242.

- Fahnenstiel, G., Y. Hong, D. Millie, M. A. Doblin, T. Johengen, and D. Reid. 2009. Marine dinoflagellate cysts in the ballast tank sediments of ships entering the Laurentian Great Lakes. *Verhandlungen Internationale Verein Limnology* 30:1035–1038.
- Flores-Moya, A., E. Costas, and V. López-Rodas. 2008. Roles of adaptation, chance and history in the evolution of the dinoflagellate *Prorocentrum triestinum*. *Naturwissenschaften* 95:697–703.
- Flynn, K., J. M. Franco, P. Fernández, B. Reguera, M. Zapata, G. Wood, and K. J. Flynn. 1994. Changes in toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen or phosphorus stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 111:99–109.
- Franco, J. M., P. Fernández, and B. Reguera. 1994. Toxin profiles of natural populations and cultures of *Alexandrium minutum* Halim from Galician (Spain) coastal waters. *J. Appl. Phycol.* 6:275–279.
- Godhe, A., S. K. Otta, A. S. Rehnstam-Holm, I. Karunasagar, and I. Karunasagar. 2001. Polymerase chain reaction in detection of *Gymnodinium mikimotoi* and *Alexandrium minutum* in field samples from southwest India. *Mar. Biotechnol.* 3:152–162.
- Gould, S. J. 1989. *Wonderful life: the Burgess Shale and the nature of history*. Norton, New York, NY.
- Gould, S. J. 2002. *The structure of evolutionary theory*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Gould, S. J., and R. C. Lewontin. 1979. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc. R. Soc. Lond. B* 205:581–598.
- Guisande, C., M. Frangópulos, I. Maneiro, A. R. Vergara, and I. Riveiro. 2002. Ecological advantages of toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* under phosphorus limitation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 225:169–176.
- Hallegraeff, G. M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32:79–99.
- Hallegraeff, G. M. 2009. Impacts of climate change on harmful algal blooms. *SciTopics*. Available at http://www.scitopics.com/Impacts_of_Climate_Change_on_Harmful_Algal_Blooms.html.
- Hallegraeff, G. M., D. A. Steffensen, and R. Wetherbee. 1988. Three estuarine Australian dinoflagellates that can produce paralytic shellfish toxins. *J. Plankton Res.* 10:533–541.
- Hansen, J., M. Sato, R. Ruedy, A. Lacis, and V. Oinas. 2000. Global warming in the twenty-first century: an alternative scenario. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9875–9880.
- Hansen, G., N. Daugbjerg, and J. M. Franco. 2003. Morphology, toxin composition and LSU rDNA phylogeny of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Denmark, with some morphological observations on other European strains. *Harmful Algae* 2:317–335.
- Hoagland, P., D. M. Anderson, Y. Kaoru, and A. W. White. 2002. The economic effects of harmful algal blooms in states: estimates, assessment issues, and information. *Estuaries* 25:819–837.
- Hwang, D. F., and Y. H. Lu. 2000. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon* 38:1491–1503.
- IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Kimura, M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Lenski, R. E., and M. Travisano. 1994. Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000 generation experiment with bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6808–6814.
- Lilly, E. L., D. M. Kulis, P. Gentien, and D. M. Anderson. 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *J. Plankton Res.* 24:443–452.
- Martins, C. A., D. Kulis, S. Franca, and D. M. Anderson. 2004. The loss of PSP toxin production in a formerly toxic *Alexandrium lusitanicum* clone. *Toxicon* 43:195–205.
- Mendoza, H., V. López-Rodas, S. González-Gil, A. Aguilera, and E. Costas. 1995. The use of polyclonal antisera and blocking of antibodies in the identification of marine dinoflagellates: species-specific and clone-specific antisera against *Gymnodinium* and *Alexandrium*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 186:103–115.
- Nehring, S. 1998. Non-indigenous phytoplankton species in the North Sea: supposed region of origin and possible transport vector. *Arch. Fish. Mar. Res.* 46:181–194.
- Ogata, T., T. Ishimaru, and M. Kodama. 1987. Effect of water temperature and light on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarens*. *Mar. Biol.* 95:217–220.
- Parkhill, J. P., and A. D. Cembella. 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarens* from northeastern Canada. *J. Plankton Res.* 21:939–955.
- Pérez-Zaballos, F. J., L. M. Ortega-Mora, G. Álvarez-García, E. Collantes-Fernández, V. Navarro-Lozano, L. García-Villada, and E. Costas. 2005. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. *J. Parasitol.* 91:507–510.
- Persich, G. R., D. M. Kulis, E. L. Lilly, D. M. Anderson, and V. M. T. García. 2003. Probable origin and toxin profile of *Alexandrium tamarens* (Lebour) Balech from southern Brazil. *Harmful Algae* 5:36–44.
- Persson, A., A. Godhe, and B. Karlson. 2000. Dinoflagellate cysts in recent sediments from the west coast of Sweden. *Bot. Mar.* 43:69–79.
- Pitcher, G. C., A. D. Cembella, L. B. Joyce, J. Larsen, T. A. Probyn, and C. Ruiz Sebastián. 2007. The dinoflagellate *Alexandrium minutum* in Cape Town harbour (South Africa): bloom characteristics, phylogenetic analysis and toxin composition. *Harmful Algae* 6:823–836.

- Raven, J. A., K. Caldeira, H. Elderfield, O. Hoegh-Guldberg, P. Liss, U. Riebesell, J. Shepperd, C. Turley, A. Watson, R. Heap, et al. 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. Royal Society, London, U.K. Available at http://www.scar.org/articles/Ocean_Acidification%281%29.pdf.
- Reboud, X., and G. Bell. 1996. Experimental evolution in *Chlamydomonas*. III. Evolution of specialist and generalist types in environments that vary in space and time. *Heredity* 78:507–514.
- Rost, B., I. Zondervan, and D. Wolf-Gladrow. 2008. Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: current knowledge, contradictions and research directions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373:227–237.
- Rouco, M., V. López-Rodas, A. Flores-Moya, and E. Costas. 2011. Evolutionary changes in growth rate and toxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* under a scenario of eutrophication and temperature increase. *Microb. Ecol.* 62:265–273.
- Spiess, E. B. 1989. *Genes in populations*. Wiley, New York, NY.
- Travisano, M., J. A. Mongold, F. A. Bennet, and R. E. Lenski. 1995. Experimental tests of the roles of adaptation, chance and history in evolution. *Science* 267:87–90.
- Usup, G., L. C. Pin, A. Ahmad, and L. P. Teen. 2002. *Alexandrium* (Dinophyceae) species in Malaysian waters. *Harmful Algae* 1:265–275.
- Vila, M., E. Garcés, M. Masó, and J. Camp. 2001. Is the distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 222:73–83.
- Wagenaar, D. A., and C. Adami. 2004. Influence of chance, history and adaptation on digital evolution. *Artif. Life* 10:181–190.
- Whitlock, M. C., P. C. Phillips, F. B. G. Moore, and S. J. Tonsor. 1995. Multiple fitness peaks and epistasis. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 26:601–629.
- Wright, S. 1932. The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. *Proc. 6th Int. Congress Genet.* 1:356–366.
- Yoshida, M., T. Ogata, C. V. Thuoc, K. Matsuoka, Y. Fukuyo, N. C. Hoi, and M. Kodama. 2000. The first finding of toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* in Vietnam. *Fish. Sci.* 66:177–179.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Zeebe, R. E., and D. Wolf-Gladrow. 2001. *CO₂ in seawater: equilibrium, kinetics, isotopes*. Elsevier oceanographic series. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

CAPÍTULO II

Adaptación del fitoplancton a la contaminación de origen antropogénico

Actualmente, la contaminación en general, y la acuática en especial, se ha convertido en una preocupación mundial (Kathuria, 2006). Entre las más importantes fuentes de contaminación acuática se encuentran los pesticidas y los metales pesados (Torres *et al.*, 2008; Smolyakov *et al.*, 2010). Sin embargo, también, se hace necesario mencionar lo que se califica como contaminación biológica, derivada de la globalización, y que supone el establecimiento de especies invasoras en diferentes ecosistemas en los que éstas son ajenas (Doren *et al.*, 2009; Ojaveer *et al.*, 2011), con el consecuente desequilibrio en el medio local y la derivada pérdida de biodiversidad.

Los contaminantes someten a los organismos a una gran presión de selección y la supervivencia dependerá de los mecanismos de adaptación a las nuevas condiciones. En **este capítulo** se ha abordado el estudio de la capacidad de adaptación de diferentes especies fitoplanctónicas frente a un grupo representativo de contaminantes de origen antropogénico, así como, la posibilidad de establecimiento de especies invasoras en los ecosistemas acuáticos derivadas de la civilización. Todo ello se corresponde con el **segundo objetivo** planteado en esta tesis.

El protocolo experimental realizado se basó en una modificación del tradicional experimento de análisis de fluctuación de Luria-Delbrück, para su utilización en cultivos líquidos, mediante el cual se pretendió dar a conocer qué mecanismo gobernaba en el proceso de la adaptación; es decir, si éste era fisiológico o bien genético producido por mutación. Para corroborar los resultados obtenidos, la experimentación se apoyó, en algunos casos, en la realización del análisis de Newcombe:

- En el primer trabajo, se estudió la capacidad de adaptación del alga clorofita *S. intermedius* frente al pesticida organoclorado conocido como lindano. Esta sustancia se incluye dentro de un grupo de compuestos ampliamente utilizados para controlar una muy variada gama de plagas con muy adversas

características medioambientales y de salud pública (Lal *et al.*, 2010). Es por ello que los residuos de lindano son contaminantes muy extendidos en los ecosistemas y, en particular, en entornos acuáticos (Weber *et al.*, 2011). En las últimas décadas, debido a la aplicación incesante de plaguicidas como el lindano, tales compuestos, altamente tóxicos, se han ido introduciendo en el terreno de las zonas agrícolas y, finalmente, han accedido en mayor o menor medida a las masas de agua a través de la escorrentía superficial. Por este motivo ejercen una fuerte presión de selección en la flora y fauna acuáticos (Belfiore & Anderson, 2001; Palumbi, 2001).

- En el segundo y el tercer trabajo, se exploraron los mecanismos de adaptación que permiten a los organismos fitoplanctónicos adaptarse al compuesto comúnmente conocido como TBT, o tributilestano. Esta sustancia se caracteriza por su extrema toxicidad en los organismos acuáticos (Bangkedphol *et al.*, 2009) y por haber sido ampliamente utilizado en las pinturas *antifouling* de los barcos (Arrhenius *et al.*, 2006), hasta su prohibición en el 2008 (Gipperth, 2009; Cao *et al.*, 2011). Dicho biocida contribuye a la contaminación del medio ambiente marino cuando se libera de las pinturas que lo contienen. Además, hay que destacar también que los organismos resistentes a los compuestos presentes en las pinturas *antifouling* pueden viajar largas distancias adheridos al caso de los barcos, liberándose en los puertos de destino y causando graves problemas de contaminación biológica por especies invasoras. Como consecuencia de esta problemática, en el segundo trabajo del presente capítulo, se estudió la adaptación del alga clorofita *D. chlorelloides* frente al TBT; el cual puede considerarse como un paso previo a la realización de un estudio mucho más amplio de los mecanismos de adaptación frente a este compuesto, para poder valorar, así, la posibilidad de que los resistentes pudieran trasladarse a largas distancias. Este nuevo objetivo se consiguió con la realización del tercer trabajo de este segundo capítulo. En su elaboración se realizó un estudio más ambicioso y con mayor profundidad, empleando en los experimentos de adaptación (Análisis de fluctuación y Newcombe) varias especies de microalgas marinas: la diatomea *N. closterium*, la prasinophyta *T. suecica* y una especie del género *Prochloron*. Sp. Asimismo, se realizaron diversos muestreos en

las zonas costeras con el fin de demostrar la introducción de especies invasoras.

- Por último, en una experimentación complementaria incorporada al final del capítulo, se estudió la adaptación del alga clorofita *D. chlorelloides* frente a dos metales pesados: plomo e iridio. El primero de ellos frecuentemente presente en los vertidos industriales y en las zonas de alta intensidad minera (Concas *et al.*, 2006). Por su parte, el iridio está presente con altos contenidos en algunos lugares significativos de la corteza terrestre, como, por ejemplo, en la conocida como “discontinuidad de Álvarez” (afloramiento hallado en Italia por Walter Álvarez con una secuencia Cretácica rica en microfósiles que súbitamente desaparece para dar lugar a una delgada capa de arcilla con abundante iridio y un registro fósil inexistente). De acuerdo con hallazgos como éste se ha sugerido que este metal fue introducido en la Tierra debido al impacto de un gigantesco meteorito, lo que, a su vez, tuvo como consecuencia directa la extinción ocurrida en el límite Cretácico-Terciario (K/T) hace 65.5 millones de años (Álvarez *et al.*, 1980; Álvarez *et al.*, 1990; Kring, 2007; Martín-Peinado & Rodríguez-Tovar, 2010; Renne *et al.*, 2013).

En todos los casos analizados los resultados sugieren que la resistencia a los contaminantes antropogénicos aparece como consecuencia de raras mutaciones, las cuales ocurren espontáneamente en las poblaciones naturales previas a la exposición al tóxico. Asimismo, se ha comprobado que existe un equilibrio, que controla la presencia de estos mutantes en las poblaciones, entre la aparición recurrente de los mutantes resistentes y su eliminación por la selección natural, debido a que tienen una eficacia biológica (*fitness*) más reducida en comparación con el genotipo salvaje, lo que hace que estén en pequeñas proporciones en las poblaciones naturales.

- **Adaptation of microalgae to lindane: A new approach for bioremediation**

Aquatic Toxicology, 109 (2012) 25-32

doi:10.1016/j.aquatox.2011.11.015



Adaptation of microalgae to lindane: A new approach for bioremediation

Raquel González, Camino García-Balboa, Mónica Rouco, Victoria Lopez-Rodas, Eduardo Costas*

Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2011
Received in revised form
24 November 2011
Accepted 28 November 2011

Keywords:

Adaptation
Bioremediation
Lindane
Microalgae
Mutation

ABSTRACT

Lindane is especially worrisome because its persistence in aquatic ecosystems, tendency to bioaccumulation and toxicity. We studied the adaptation of freshwater cyanobacteria and microalgae to resist lindane using an experimental model to distinguish if lindane-resistant cells had their origin in random spontaneous pre-selective mutations (which occur prior to the lindane exposure), or if lindane-resistant cells arose by a mechanism of physiological acclimation during the exposure to the selective agent. Although further research is needed to determine the different mechanisms contributing to the bio-elimination of lindane, this study, however, provides an approach to the bioremediation abilities of the lindane-resistant cells. Wild type strains of the experimental organisms were exposed to increasing lindane levels to estimate lethal concentrations. Growth of wild-type cells was completely inhibited at 5 mg/L concentration of lindane. However, after further incubation in lindane for several weeks, occasionally the growth of rare lindane-resistant cells was found. A fluctuation analysis demonstrated that lindane-resistant cells arise only by rare spontaneous mutations that occur randomly prior to exposure to lindane (lindane-resistance did not occur as a result of physiological mechanisms). The rate of mutation from lindane sensitivity to resistance was between 1.48×10^{-5} and 2.35×10^{-7} mutations per cell per generation. Lindane-resistant mutants exhibited a diminished fitness in the absence of lindane, but only these variants were able to grow at lindane concentrations higher than 5 mg/L (until concentrations as high as 40 mg/L). Lindane-resistant mutants may be maintained in uncontaminated waters as the result of a balance between new resistant mutants arising from spontaneous mutation and resistant cells eliminated by natural selection waters via clone selection. The lindane-resistant cells were also used to test the potential of microalgae to remove lindane. Three concentrations (4, 15 and 40 mg/L) were chosen as a model. In these exposures the lindane-resistant cells showed a great capacity to remove lindane (until 99% lindane was eliminated). Apparently, bioremediation based on lindane-resistant cells could be a great opportunity for cleaning up of lindane- and other chlorinated organics-polluted habitats.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Organochlorines are a large class of multipurpose chlorinated hydrocarbon chemicals, which have been extensively used to control a wide range of agricultural, horticultural, and public health pests (Lal et al., 2010). These pesticides are characterized by their long persistence, toxicity and teratogenicity. Their residues result in serious problems, not only in the cultivated soils where they are applied, but also in the crops that systematically retain part of these residues in non-target organisms (El-Bestawy et al., 2007). Hexachlorocyclohexane (HCH), commonly known as lindane, is the term, which collectively identifies the eight isomers of the HCH, and gamma-hexachlorocyclohexane (γ -HCH or lindane) which is the only one with insecticidal properties and also the most toxic (Breivik et al., 1999). Lindane solubility, volatility, biodegradability

capacity and sorption characteristics explain its relative recalcitrance and long-range transport. Because of its characteristics it has long-term persistence in water (Phillips et al., 2005).

Despite the possible environmental problems deriving from its toxicity and bioaccumulation capacity, about 600,000 tonnes of lindane were produced throughout the world between the 1940s and the 1990s for agricultural and pharmaceutical applications (Li, 1999; Vijgen et al., 2006). In an attempt to control the undesirable effects of lindane on environmental quality and animal health, i.e., accumulation in food commodities, neurotoxic effects, disruption of lipid metabolism and ovarian cycles, the compounds being potential carcinogens and teratogens (Singh et al., 2000), the production and use of organochlorine compounds was banned or severely restricted during the 1970s and 1980s in most developed countries. Nevertheless, the demand for organochlorine pesticides increased in some developing countries in Africa, Latin America and Asia (Tanabe et al., 1993).

Lindane residues are, now widespread contaminants in the ecosystem, and particularly, in aquatic environments. Due to the

* Corresponding author.

E-mail address: ecostas@vet.ucm.es (E. Costas).

unrelenting application of pesticides, such as lindane, in recent decades, these toxic compounds are introduced into to land-based agriculture systems and are eventually carried into water bodies through surface runoff, whereby they exert a strong selection pressure in flora and fauna (Belfiore and Anderson, 2001; Palumbi, 2001).

The direct effect of lindane to non-target organisms such as terrestrial vertebrates is reasonably well understood (Miglioranza et al., 2002; Waliszewski et al., 2004; Franciskovic-Bilinski et al., 2005; Tao et al., 2005) but little is known about organisms as abundant and important as microbes. The study of the effect of lindane on bacteria and protists is clearly needed since important nutrient cycles may be affected if essential microbes succumb to anthropogenic toxins (Woodruff, 2001). Of particular importance is the study of microalgae and cyanobacteria because they also constitute the basis of the aquatic food web, supporting more than half of the global primary production (Kirk, 1994; Falkowski and Raven, 1997). The tolerance of phytoplankton populations to contaminated environments is, thereby, very relevant from an ecological point of view, since their responses will undoubtedly affect upper trophic levels. The ecological consequences of lindane contamination will depend on the ability of microalgae to adapt to this contaminant.

It seems that phytoplankton populations are able to rapidly adapt to a wide variety of pollutants (Costas et al., 2001; Garcia-Villada et al., 2004; Lopez-Rodas et al., 2001, 2009a). Phytoplankton can grow in the presence of toxic compounds as a result of physiological adaptation (i.e. acclimatization), supported by modifications of gene expression (Bradshaw and Hardwick, 1989; Fogg, 2001). Additionally, when the concentration of the toxic element exceeds the levels of physiological adaptation, survival depends almost exclusively on adaptive evolution driven by mutations that confer resistance (Sniegowski and Lenski, 1995; Belfiore and Anderson, 2001). Genetic adaptation has allowed microalgae to thrive in extremely hostile environments under high levels of pollutants and other extreme conditions (Costas et al., 2007, 2008; Flores-Moya et al., 2005; Lopez-Rodas et al., 2008a,b, 2009b). Phytoplankton adaptation capacity to lindane contamination is important to understand the ecological consequences of lindane residues in aquatic ecosystems.

In addition, from a biotechnological point of view, the investigation of lindane-resistant organisms as a medium of bioremediation seems very interesting. The application of biotechnological processes involving microorganisms with the objective of solving environmental pollution problems is gradually growing. Bioremediation, which includes the utilization of microorganisms for the biodegradation of target pollutants, is considered an efficient and environmentally safe technology for inexpensive decontamination of polluted systems, industrial waste and contaminated soils (Alexander, 1999). A wide range of microorganisms capable for degrading HCH-isomers have been isolated and characterized. They are mainly fungi (Arisoy and Kolankaya, 1997; Fragoeiro and Magan, 2005; Rigas et al., 2007) and bacteria (van Eekert et al., 1998; Thomas et al., 1996; Gupta et al., 2000; Manonmani et al., 2000; Okeke et al., 2002; Böltner et al., 2005; Kumar et al., 2005; van Doesburg et al., 2005; Chaudhary et al., 2006). In contrast, little is known about the capacity of phytoplankton to accumulate or to degrade lindane residues.

In order to study the adaptation of phytoplankton to lindane contamination, a toxicity test, as well as a genetic analysis to discriminate between adaptation mechanisms (i.e. physiological acclimation, selection of rare spontaneous mutations and others) was performed. As a second aim, we attempted to analyze if lindane-resistant cells have capabilities for lindane degradation and could possibly be used for bioremediation processes.

2. Material and methods

2.1. Organisms and growth conditions

Laboratory experiments were performed using four strains belonging to Chlorophyta and Cyanobacteria, all obtained from the Algal Culture Collection of the Veterinary Faculty, Complutense University, Madrid (Spain). *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nau-mann) Komárek and Perman (Chlorophyta) was isolated from a high-mountain, pristine lagoon in Sierra Nevada National Park (SE Spain) and *Scenedesmus intermedius* (Chodat) (Chlorophyta), from a new pristine water supply reservoir (Melonares, Sevilla, SW Spain). The two cyanobacterial strains, *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Lemmermann (MaD7) and *Pseudoanabaena limnetica* (Lemmermann) Komárek, were isolated from a pristine lagoon in Doñana National Park (SW Spain).

All cultures were grown axenically in ventilated cell culture flasks covered with a filter cap (Greiner, Bio-One Inc Longwood, NJ, USA) which contained BG11 medium (Sigma–Aldrich) for freshwater algae and cyanobacteria. Flasks were exposed at 20 °C and under continuous illumination of 120 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm. The cultures were maintained in mid-log exponential growth by serial transfers of a cell inoculum to fresh medium (once per month). Under these conditions, all the cultures grew asexually. Prior to the experiments, the cultures were re-cloned by isolating a single cell in order to avoid the inclusion of any previous spontaneous mutants that could have appeared in the cultures.

2.2. Toxicity test: effect of lindane on microalgae growth

The effect of lindane (Sigma Chemical Co., USA) on the growth rate of the four wild-type strains was assessed as follows. Since lindane is a very poorly soluble compound in water, and in order to possibly improve the mass transfer of lindane, cultures were prepared using a second liquid phase (0.5% ethanol). Controls were maintained in ethanol also. This concentration has not detectable effects in growth rate with good partition for lindane. According to this, different stocks solutions were prepared using ethanol as a second organic phase and the cultures were supplemented with small aliquots (25 μL) of lindane stocks to obtain the concentrations of 5, 15, 40, 65 and 120 mg/L. Each experimental culture was inoculated with 5×10^5 cells from mid-log exponentially growing cultures. Growth inhibition was measured in triplicate for each strain and each experimental dose, and three unexposed controls were also prepared. The effect of pesticide was estimated by calculating acclimated maximal growth rate (m) in mid-log exponentially growing cells, according to the Eq. (1) (Crow and Kimura, 1970)

$$N_t = N_0 e^{mt} \quad (1)$$

where N_t and N_0 represent the total cells number at the end and at the start of the experiment, respectively, and t is the time of exposure to the toxic agent (7 days). Experiments and controls were blind counted (i.e., the person counting the test did not know the identity of the tested sample). *D. chlorelloides* was counted using a Beckman (Brea, CA, USA) Z2 particle counter. *S. intermedius*, *M. aeruginosa* and *P. limnetica* were directly counted under an inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss Oberkochen, Germany) using Uri-glass settling chambers (Biosiga, Cona, Italy).

2.3. Fluctuation analysis

A modified Luria–Delbrück analysis was performed as previously described (Lopez-Rodas et al., 2001) to distinguish resistant cells that had their origin in random spontaneous pre-selective mutations (prior to the lindane exposure) from those arising

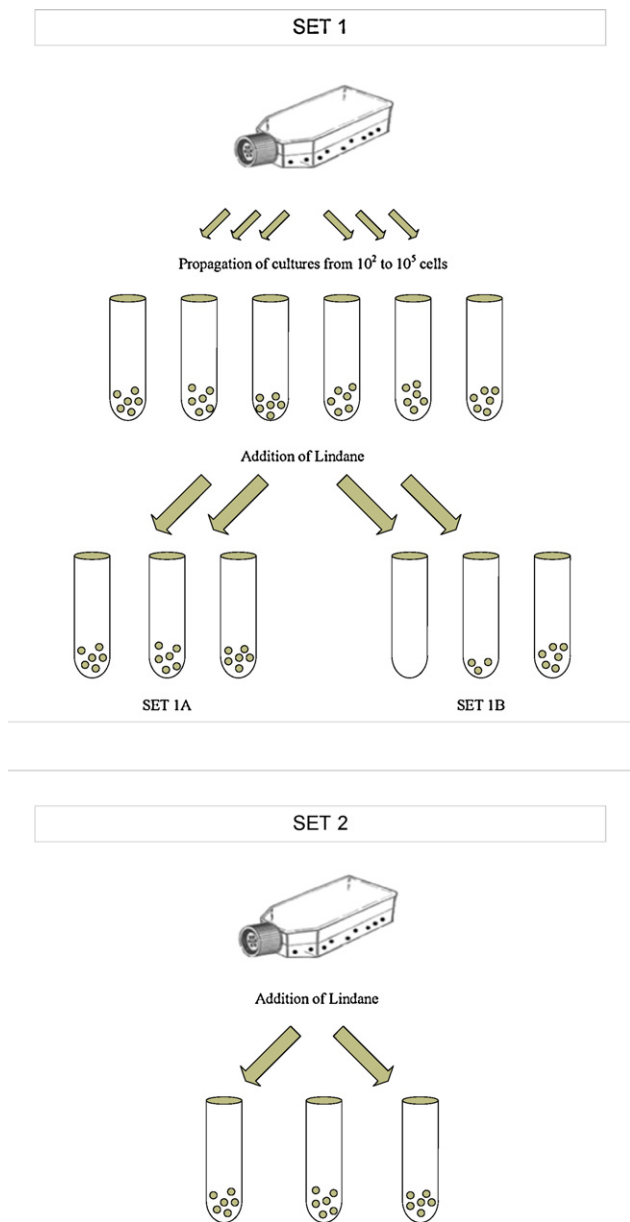


Fig. 1. Schematic diagram of the modified Luria and Delbrück (1943) fluctuation analysis. In set 1, several cultures each inoculated with small inoculums were propagated until a high cell density was reached, and then a lethal concentration of lindane was added. Set 1A: physiological adaptation (i.e. acclimation) or possible adaptive mutations. In this case, the number of resistant cells in all the cultures must be similar. Set 1B: adaptation by mutations occurring in the period of the propagation of cultures, that is, before exposure to the selective agent. One mutational event occurred late in the propagation of culture 2 (therefore, the density of lindane-resistant cells found is low) and early in the propagation of culture 3 (thus, density of lindane-resistant cells found is higher than in culture 2); no mutational events occurred in culture 1. Therefore, the variance/mean ratio of the number of resistant cells per replicate must be >1 . Set 2 samples the variance of parental populations as an experimental control. In this case, the number of resistant cells in all the cultures must be similar (the distribution should be Poisson, with a variance approximately equal to the mean).

through acquired post-selective adaptation (during the exposure to lindane) (Fig. 1). The modification of the analysis involves the use of liquid medium specific for microalgae and containing the selective agent rather than plating on a solid medium, as was done by Luria and Delbrück (1943) with bacterial cultures.

Briefly, for each one of the different concentrations selected, two different sets of experimental cultures were prepared (Fig. 1). In set 1, 48 culture tubes were inoculated with approximately 10^2 cells

(N_0 ; a number small enough to reasonably ensure the absence of pre-existing mutants in the strain). Cultures were grown in BG11 medium until a concentration of c. 10^5 cells (N_t) was reached. Then, fresh liquid medium containing the selective agent (lindane) was supplemented to each tube. In set 2 (control trials), 24 culture tubes were inoculated directly with c. 10^5 cells (from the same parental populations as set 1) in fresh liquid BG11 medium containing the selective agent (lindane). Cultures from both sets 1 and 2 were grown in a total volume of 5 mL in Sarstedt sterile tubes (Nümbrecht). Cultures were grown for 60 days; time enough to ensure that resistant mutant cells could generate enough progeny to be detected. After this period, all tubes were counted.

The result from the fluctuation analysis after the selected period can explain the presence of resistant cells in two ways. Each result is interpreted as the independent consequence of two different phenomena of adaptation. In the first case, if resistant cells arose during the exposure to the selective agent (i.e. by physiological adaptation), the variance in the number of cells per culture would be low because every cell is likely to have the same chance of developing resistance (Fig. 1, set 1A). Consequently, inter-culture (tube-to-tube) variation would be consistent with the Poisson model (i.e., the variance of these replicate samples would be equal to the mean). By contrast, if resistant cells arose before the exposure to the selective agent (i.e., genetic adaptation by rare spontaneous mutation occurring during the time in which the cultures grew from N_0 to N_t), a high variation in the number of resistant cells per culture would be found (Fig. 1, set 1B). The tube-to-tube variation would not be consistent with the Poisson model (i.e. variance $>$ mean). Fluctuation analysis can likewise show the possibility of no adaptation if no resistant cells are observed after the incubation period in any of the experimental cultures.

Since set 2 is the control of the experiment, variation is due only to random sampling and variation from tube to tube would be consistent with the Poisson model.

If the variance/mean ratio of set 1 is significantly greater than the variance/mean ratio of set 2 (fluctuation), this confirms that resistant cells arose by rare mutations that occurred before the exposure to lindane (i.e., a pre-selective mechanism). If a similar variance: mean ratio between set 1 and set 2 is found, it confirms that resistant cells arose during the exposure to the selecting agent (i.e., a post-selective mechanism).

The fluctuation analysis also allows the estimation of the rate of appearance of resistant cells. The proportion of cultures of set 1 showing nonresistant cells after lindane exposure (i.e. the first term of the Poisson distribution, named the P_0 estimator; Luria and Delbrück, 1943) was the parameter used to calculate the mutation rate (μ) according to the Eq. (2):

$$\mu = \frac{\log_e P_0}{N_t - N_0} \quad (2)$$

2.4. Mutation-selection equilibrium

If mutation from wild-type, sensitive allele to resistant cells is recurrent and, in addition, resistant alleles are detrimental to fitness when the selective agent (lindane) is not present in the medium, then most of these mutants would be eliminated eventually by natural selection, if not by chance. At any given time there will, however, be a certain number of resistant cells that are not yet eliminated. According to Kimura and Maruyama (1966), the balance between μ and the rate of selective elimination (s), Eq. (3), will determine the average number of such mutants.

$$q = \frac{\mu}{\mu + s} \quad (3)$$

where q is the frequency of the temperature-resistant allele and s is the coefficient of selection calculated according to the Eq. (4).

$$s = 1 - \left(\frac{m_T^r}{m_T^s} \right), \quad (4)$$

where m_T^r and m_T^s are the Malthusian fitness of temperature-resistant and temperature-sensitive cells measured in nonselective conditions (i.e. BG-11 medium), respectively.

2.5. Bioremediation assay

Three selected cultures from set 1 of fluctuation analysis, resistant to 5, 15 and 40 mg/L of lindane, respectively, were chosen to inoculate the bioremediation assays. The sets were prepared in 10-mL sterile tubes containing 5 mL of sterilized BG11 culture medium and inoculated with 10^5 cells. As described previously, since lindane is insoluble in water, a stock solution was prepared from technical grade lindane in ethanol (0.5%) and each culture was supplemented with small aliquots of lindane stock at three final concentrations of 5, 15 and 40 mg/L. In addition, abiotic lindane removal was monitored in uninoculated tubes (controls) prepared for each concentration. These tubes contained the culture medium without lindane added. Flasks were exposed at 20 °C and under continuous illumination of $120 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm. Cultures were maintained for 60 days.

2.6. Determination of lindane

Lindane concentration was measured by means of gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD). The total volume of each culture was filtered through a glass fiber filter of 25 mm (diameter), and the two phases, the liquid filtered solution and the solid phase retained in the filter was analyzed.

Prior to the analysis, the total volume of each sample or the solid retained in the filter was extracted with dichloromethane and concentrated to a final volume of 1 mL. An aliquot of 1 μL was injected into the gas chromatograph (GC) Agilent 6890 N equipped with an electron capture detector (EDC), on a DB-5 fused-silica capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.3 μm film thickness). The injection took place at oven temperature of 275 °C. Nitrogen (carrier) gas flow rate was 1.5 mL min^{-1} . Lindane was identified by comparing its chromatographic retention time ($12.31 \pm 0.2 \text{ min}$) with that of a technical standard. The concentration of lindane was calculated by comparing the total area of each detected peak with the total area of the standard pesticide. Reliability and precision of all measurements were established according to the British Standards Institute (BSI, 1979) and Thrusfield (1995).

3. Results

3.1. Toxic effect of lindane on cells

Lindane was toxic for all the assayed organisms. The growth of both cyanobacteria species (*M. aeruginosa* and *P. limnetica*) as well as both chlorophyta species (*D. cholorelloides* and *S. intermedius*) was completely inhibited at concentrations higher than 5 mg/L of lindane. All the cells died in within the first 3 days. Consequently, a linear regression of lindane concentration versus growth rate showed statistically significant ($p < 0.01$) very strongly negative slopes (from -0.0010 to -0.0016).

3.2. Adaptation of *S. intermedius* to lindane

Owing to the varied tolerance to lindane among species, fluctuation analysis was only performed with the strain, which

Table 1

Fluctuation analysis from lindane-sensitivity to lindane-resistance under different concentrations of lindane.

	Set 1	Set 2
Adaptation of <i>S. intermedius</i> a 5 mg/L lindane		
No. of replicate cultures	48	24
No. of cultures containing the following no. of TBT resistant cells		
0	12	0
$1 \times 10^5 - 8 \times 10^5$	17	0
$8 \times 10^5 - 2 \times 10^6$	11	0
$2 \times 10^6 - 6 \times 10^6$	7	20
$> 6 \times 10^6$	1	0
Variance/mean ratio (of the number of resistant cells per replicate)	21.6 ^a	1.1 ^b
Fluctuation	Yes	No
Adaptation process	Genetic	
μ (Mutants per cell per generation)	1.478×10^{-5}	
<i>S. intermedius</i> 15 mg/L		
No. of replicate cultures	48	24
No. of cultures containing the following no. of TBT resistant cells		
0	37	0
$1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$	3	0
$5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	1	0
$1 \times 10^4 - 5 \times 10^4$	5	20
$> 5 \times 10^4$	1	0
Variance/mean ratio (of the number of resistant cells per replicate)	19.4 ^a	1.1 ^b
Fluctuation	Yes	No
Adaptation process	Genetic	
μ (Mutants per cell per generation)	2.91×10^{-6}	
<i>S. intermedius</i> 40 mg/L		
No. of replicate cultures	48	24
No. of cultures containing the following no. of TBT resistant cells		
0	47	0
$1 \times 10^3 - 3 \times 10^3$	0	0
$3 \times 10^3 - 5 \times 10^3$	0	24
$5 \times 10^3 - 8 \times 10^3$	1	0
$> 8 \times 10^3$	0	0
Variance/mean ratio (of the number of resistant cells per replicate)	$> 100^a$	1.0 ^b
Fluctuation	Yes	No
Adaptation process	Genetic	
μ (Mutants per cell per generation)	2.35×10^{-7}	
<i>S. intermedius</i> 120 mg/L		
No. of replicate cultures	45	20
No. of cultures containing the following no. of TBT resistant cells		
0	45	20
Adaptation process	None	

^a Variance/mean > 1 ; $P < 0.001$, using χ^2 as a test of goodness of fit.

^b Variance/mean = 1; $P > 0.05$, using χ^2 as a test of goodness of fit.

demonstrated the highest resistance: *S. intermedius*, at four increasing concentrations (5, 15, 40 and 120 mg/L).

S. intermedius was able to adapt to lindane contamination by means of two different mechanisms depending on the toxic concentration at which it was exposed (Table 1). A massive destruction of cells was observed in three of the four experiments (5, 15 and 40 mg/L) immediately after the addition of lindane. Nevertheless, after further incubation for 60 days, cell density increased in some cultures, which indicates the appearance of a lindane-resistant variant (with the exception of the highest concentration). The cells were not able to grow after further incubation at a concentration of lindane of 120 mg/L. In set 1, only some cultures showed appreciable cell growth (Table 2) and a high fluctuation

Table 2

Growth rate (m), mutation rate from lindane-sensitive cells to lindane-resistant cells (μ), coefficient of selection against resistant mutant (s) and frequency of the lindane-resistance allele (q) in *S. intermedius*, during genetic adaptation to lindane.

Doses	m_{Lr}	m_{Ls}	μ	s	q
5 mg/L	0.13	0.63	1.478×10^{-5}	0.87	42.2×10^{-4}
15 mg/L	0.12	0.63	2.91×10^{-6}	0.88	18.1×10^{-4}
40 mg/L	0.22	0.63	2.35×10^{-7}	0.77	5.52×10^{-4}

Table 3
Removal of lindane by the selected microalgal cultures.

Theoretical lindane concentrations (mg/L)	Lindane concentrations in abiotic controls (mg/L \pm se)	Residual lindane concentrations at the liquid phase (mg/L \pm se)	Residual lindane concentrations retained in the filter (mg/L \pm se)	Removal efficiency (%)
5	5.2 \pm 0.2	0.07 \pm 0.008	0.27 \pm 0.01	98.65
15	15.9 \pm 0.7	0.19 \pm 0.002	0.19 \pm 0.01	98.80
40	38.4 \pm 2.0	9.5 \pm 0.104	9.5 \pm 0.06	75.26

in the number of resistant cells per culture flask (from 0 to $>10^5$) was found (Table 1). On the contrary, set 2 culture flasks (controls) displayed small variation, which can be attributed to the experimental error (Table 1). Consequently, in set 1 cultures the variance significantly exceeded the mean (variance/mean ratio >1 ; $p < 0.001$ using χ^2 as a test of goodness of fit). As the large fluctuation found in set 1 cultures is related to processes different than the sampling error, it could be inferred that lindane-resistant cells arose by rare, pre-selective spontaneous mutations rather than by specific physiological adaptation appearing in response to lindane.

The spontaneous mutation rate estimated from lindane sensitivity to resistance in *S. intermedius*, using the P_0 estimator, was 1.48×10^{-5} ; 2.91×10^{-6} ; and 2.35×10^{-7} mutations per cell per generation at 5 mg/L, 15 mg/L, and 40 mg/L of lindane, respectively (Table 1).

Isolated lindane-resistant (Lr) mutants growing in the absence of the selective agent (i.e., without lindane in the culture medium) showed lower growth rates than those found in lindane-sensitive (Ls) cells (growth rates $m = 0.13$ at 5 mg/L, 0.12 at 15 mg/L and 0.22 at 40 mg/L). Relative values of fitness were used to compute the coefficient of selection of Lr mutants ($s = 0.87$ at 5 mg/L, 0.88 at 15 mg/L and 0.77 at 40 mg/L). The frequency (q) of lindane-resistant alleles, in wild-type populations in the absence of the pesticide, was calculated by using s and μ values. A frequency (q) of 41.2, 18.1 and 5.52 lindane-resistant mutants per 10^4 wild-type cells (for 5, 15 and 40 mg/L respectively) could be maintained in the absence of lindane as the result of the equilibrium between recurrent mutation and selection (Table 2).

3.3. Bioremoval of lindane

The cultures obtained from the fluctuation analysis exhibited a great capacity to remove lindane, as indicated by the small concentration of lindane measured at the finish of the test (Table 3). The results obtained in abiotic controls confirmed the essential and determinant role of microalgae in lindane depletion: the concentration of lindane in abiotic controls, exposed under the same conditions as the biotic assays and for the same period of 60 days were 5.2 mg/L, 15.9 mg/L and 38.4 mg/L, respectively. The concentrations of lindane measured in the liquid phase after the treatment were 0.07, 0.11 and 3.1 mg/L (the respective initial concentrations were 5, 15 and 40 mg/L). These results represent a removal efficiency of 98.6%, 99.26% and 92.25%.

In this way, in the trial with an initial concentration of 5 mg/L of lindane at the starting time, only 0.07 mg/L of lindane remained in the cultures after the treatment. In the culture where the initial concentration of lindane was 15 mg/L, the final concentration detected was 0.11 mg/L. Finally, a concentration as high as 40 mg/L of lindane, not only toxic to the cells but also microalgal cells were able to eliminate as much as 36.9 mg/L of lindane. Residual lindane was also analyzed in the filters. The concentrations were 0.27, 0.19 and 9.5 mg/L for the cultures prepared at 5, 15 and 40 mg/L, respectively.

Reliability of lindane measurements was higher than 89% in all the cases.

4. Discussion

One of the major problems facing the industrialized world today is the contamination of soils, sediments, air, and water with hazardous and toxic chemicals. In particular, freshwater habitats close to agricultural areas are exposed to a large array of pesticides from modern agriculture (Junghans et al., 2006) exerting a great selection pressure on phytoplankton populations. If the concentration of these toxic compounds exceeds the lethal value for the sensitive, wild-strains of phytoplankters, the immediate effect would be its local extinction. Nevertheless, unpredictable evolutionary novelties (such as resistant strains) could also arise (Myers and Knoll, 2001) and the survival of these organisms could only be achieved by some kind of adaptation.

The toxicity tests in this work showed the toxic effect of lindane for both microalgae and cyanobacteria, although different degrees of tolerance exist between different species. The growth of the two cyanobacteria species and the chlorophyta *D. chlorelloides* was inhibited at the lowest exposure dose of lindane (5 mg/L). Since *S. intermedius* presented the highest tolerance and its growth was not severely affected until 15 mg/L of lindane, this strain was selected for the fluctuation analysis experiments. When *S. intermedius* cultures were treated with lindane (concentrations of 5, 15, 40 mg/L) they became clear after some days due to the destruction of the sensitive cells by the toxic effect of the pesticide. However, after further incubation, some cultures became colored again, due to the growth of resistant cells. The key to understand the adaptation of microalgae to survive in a lindane-contaminated environment is to analyze the mechanisms conducting to the proliferation of rare resistant cells under such lethal conditions.

Fluctuation analysis is the appropriate procedure to discriminate between lindane-resistant cells arising by rare spontaneous mutations occurring randomly during propagation of organisms under nonselective conditions (i.e., prior to exposure to lindane) and lindane-resistant cells arising through adaptive mutation in response to selection (reviewed by Sniegowski, 2005) or through acclimation, usually resulting from modifications of gene expression, when conditions do not exceed physiological limits, i.e. when the cultures are exposed to low concentrations of lindane. The high fluctuation in the number of pesticide-resistant cells observed in set 1 cultures, in contrast with low fluctuation of set 2 controls, shows that pesticide-resistant cells have arisen from rare, pre-selective spontaneous mutations occurring randomly during the replication of organisms prior to exposure to the pesticides. The pesticide did not stimulate the appearance of resistant cells and the rapid lethal effect of lindane seems unlikely to allow the appearance of adaptive mutations.

Adaptation to lindane contamination seems to be achieved by a single mutation, taking place much more rapidly than survival requiring multiple mutations. Several classic works on adaptation of microalgae to antibiotics have found that antibiotic-resistance depends exclusively on single mutations in nuclear or chloroplast genes (Sager, 1954, 1962, 1977, 1985). Similarly, recent evidence suggests that mutation at one locus can achieve adaptation of mesophile microalgae to diverse hostile natural environments (Costas et al., 2007, 2008; Lopez-Rodas et al., 2008a; Flores-Moya et al., 2005) as well as to severe anthropogenic contamination

(Costas et al., 2001; Lopez-Rodas et al., 2001, 2007; Garcia-Villada et al., 2004).

The mutation rates from lindane-sensitivity to lindane-resistance found at the two lowest concentrations (5 and 15 mg/L) were around the same ranges as those that have been described before for the resistance to several biocides in other cyanobacterial and microalgae species (Costas et al., 2001; Lopez-Rodas et al., 2001; Baos et al., 2002; Garcia-Villada et al., 2002, 2004). However, the mutation rates at the highest concentration tested (40 mg/L: 2.35×10^{-7}) were one order of magnitude lower than the mutation rates that have been usually described but of the same order of magnitude than those found for the resistance to sulfureous waters in the chlorophycean *Spirogyra insignis* (2.7×10^{-7} mutants per cell per generation) (Flores-Moya et al., 2005). Mutations conferring resistance to phytoplanktonic organisms inhabiting extremely toxic environments seem thereby to be rarer than those required to assure resistance at less toxic environments.

Ultimately, it could be possible that resistance would not be achieved if selection pressure were so extreme that any rare mutation could assure adaptation. This is the case of the highest concentration tested in this work (i.e. 120 mg/L). Resistance brings with it an associated cost, the so-called resistance-cost.

Resistant alleles present a detriment in fitness that benefits wild-type alleles in non-selective environments. Mutation, however, is recurrent and new resistant mutants arise each generation although most of them disappear eventually due to natural selection or chance (Spiess, 1989).

At any one time, there will be a certain number of mutants in populations, which have not yet been eliminated. The average number of such mutants would be determined by the balance between the mutation rate and the rate of selective elimination as: $\mu(1-q) = q(1-s)$, where: μ is the mutation rate; q is the allele frequency of the mutant; and s is the selection coefficient of the mutant (Crow and Kimura, 1970; Spiess, 1989). The average number of lindane-resistant mutants to 5, 15 and 40 mg/L of lindane that are present naturally in lindane-free populations is 41.2 18.1 and 5.52 lindane-resistant per 10^4 wild-type cells, respectively. Consequently, ancestral microalgae populations seem to be constituted by a clone line of wild-type sensitive genotype and simultaneously, by a clone line of lindane-resistant mutants, in a very small fraction which would assure the maintenance of phytoplankton populations at lindane concentrations as high as 40 mg/L.

In addition to our interest of studying phytoplankton resistance to lindane from an evolutionary point of view, we consider the possible employment of lindane-resistant cells in bioremediation processes interesting. The biotechnological applications of algae have become significant in the last decades. Algae are becoming important in the energy technology, biodegradation and bioremediation processes (reviewed by Semple et al., 1999). The existence of a phytoplanktonic strain resistant to lindane and with lindane-removal capacities seems promising in reducing lindane residues in freshwater ecosystems, especially in those close to agricultural areas. It is known that a range of naturally occurring microorganisms degrades organic pollutants in aquatic environments. Although most of the research has been focused on bacteria and fungi (Benimelia et al., 2008; Rigas et al., 2007; Tejomayee and Puranik, 2007), the capacity of microalgae to degrade organic compounds has also been tackled (Semple et al., 1999). Kobayashi and Rittmann (1982) observed the capacity of some algae (*Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*) not only to bioaccumulate but also to transform lindane to pCCH under aerobic conditions.

At the present study it is proven that lindane-resistant cells of *S. intermedius* were able to eliminate lindane in the range of concentrations investigated (5–40 mg/L) highly efficiently. A substantial decline of the concentration of lindane was observed in all the flasks tested after 60 days of treatment, which was associated with

the capacity of microalgae to remove the contaminant from the medium. This decrease was not observed in the abiotic controls (without cells), which excludes the possibility of the involvement of any abiotic process (chemical and/or physical) in lindane depletion.

Although a lindane concentration as high as 10 mg/L is reported to possibly suppress the metabolic activity of some species (El-Bestawy et al., 2007), in the present study *S. intermedius* exhibited excellent removal capabilities even at the highest concentration tested (40 mg/L). This is a very promising result, because this concentration is far from the most tested lindane concentrations in bioremediation reports. In addition, the concentrations tested exceed the values measured at natural conditions. This result lets us to predict a positive adaptation and an effective bioremediation by the resistant microalgae in the low concentrations normally detected in the environment.

The concentration of lindane in the liquid phase after the treatment was very low when compared with the values of abiotic controls, where the concentrations remained close to the values measured at the start. In addition, the concentration of lindane detected in the filters (filtration was the operation used to separate the biomass from the liquid phase where the target contaminant was present) revealed that a minimal percentage of the initial concentration of lindane was retained (0.07, 0.11 and 3.1 mg/L for the initial concentrations of 5, 15 and 40 mg/L). These results let us to advance some topics on the removal of lindane. We propose that lindane was biodegraded and transformed into another compound (or compounds) by means of a biochemical or enzymatic process, as is demonstrated by the high values of removal efficiency (around 95%) measured at the liquid phase. However, the contribution of physical processes such as bioadsorption, bioaccumulation or adhesion in lindane removal is small, as demonstrated by the insignificant values of lindane concentration detected in the filters, where residual biomass was recovered.

In short, we present a first study demonstrating that microalgae are capable of removing lindane compounds from a liquid medium but the mechanisms involved in this process are still unclear. Although the results obtained point to biodegradation as the most important mechanism evolved in the bioremediation process, further research is needed to better understand the possible contribution of bioadsorption and/or bioaccumulation to the elimination of lindane. Little information has been published about the action mechanism of pesticides on microalgae. Examples of microalgae studies on functions influenced by lindane and/or other pesticides are following: the herbicide bentazon was highly toxic to the marine diatom *Skeletonema costatum*. Even a very low concentration of bentazon rapidly lead to a Fv/Fn decrease, while affects algal growth after 24 h of exposure (Macedo et al., 2008). In contrast, the estuarine microalga *Tetraselmis gracilis* exhibited the ability to concentrate the organochlorine insecticide from the medium in which they are growing (Asma and Mathew, 2001). Another experiments on the accumulation of lindane (γ -BCH) by the primary producers *Chlorella spec.* and *Chlorella pyrenoidosa* revealed irreparable damage to the algal cells through loss of chlorophyll, coagulation and complete sedimentation at concentrations of the pesticide greater than 300 μ g/L (Hansen, 1979). Finally, lindane and chlorpyrifos (both agrochemicals) affected the gross and net photosynthesis and respiration of the microalgae *C. vulgaris* (Iannacone and Gutiérrez, 1999).

In addition, it would be interesting to investigate the optimal environmental conditions to improve the degradation capacity of the microalgal cells in order to consider the option of applying other technologies to improve the yields of pollutant elimination.

The kinetic of the process must also be improved. Resistant microalgae cultures with more rapid velocities of biodegradation can be obtained by means of the selection of resistant cells to a

particular toxicant, which exhibit the additional property of exhibiting high velocities of growth.

In addition, it is necessary to study further if this strain would have the ability of removal lindane in soils, sediments, freshwater ecosystems and other contaminated environments. The employment of algal biomass to clean and restore polluted environments is the final objective of this starting research.

5. Conclusions

Lindane may be considered toxic for phytoplankton, concentrations around 5 mg/L cause a significant decrease in growth rates in almost all the species tested. Lindane-resistant microalgae arose by rare mutations, which occur spontaneously in natural populations prior to lindane exposure. The balance between the recurrent appearance of lindane-resistant mutants and their elimination by natural selection controls the presence of lindane-resistant cells in the natural populations. The microalgal species investigated in the present study are highly recommended for bioremediation of aquatic systems contaminated by lindane and other chlorinated organics. Bioremediation by the microalgae could help in decontaminating polluted lakes and in cleaning contaminated effluents before they are discharged into aquatic systems, providing a low-cost and naturally renewable technology.

Acknowledgments

This work has by been financially supported by the Spanish Ministry of Sciences and Innovation through the grants CTM2008-05680 C02-01/MAR and CGL2008-00652/BOS. R.G. thanks the financial support given by the Ministerio de Educación y Ciencia, through FPU program. Special thanks are given Lara de Miguel Fernandez and Antonio Rosado by technical support.

References

- Alexander, M., 1999. Biodegradation and Bioremediation, second ed. Academic Press, San Diego.
- Arisoy, M., Kolankaya, N., 1997. Biodegradation of lindane by *Pleurotus sajor-caju* and toxic effects of lindane and its metabolites on mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 352–359.
- Asma, V.M., Mathew, K.J., 2001. Uptake of an organochlorine insecticide by a microalga *Tetraselmis gracilis*. *Indian J. Fish.* 48, 49–53.
- Baños, R., García-Villada, L., Agrelo, M., López-Rodas, V., Hiraldo, F., Costas, E., 2002. Short-term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental model analyzing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *Eur. J. Phycol.* 37, 593–600.
- Belfiore, N.M., Anderson, S.L., 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat. Res.* 489, 97–122.
- Benimelia, C.S., Fuentes, M.S., Abate, C.M., Amoroso, M.J., 2008. Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 61, 233–239.
- British Standards Institute, 1979. Precision of tests methods I. Guide for the determination of repeatability and reproductibility for a standard test method for inter-laboratory tests. BS 5497. Part I. British Standards Institute, London.
- Böltner, D., Moreno-Morillas, S., Ramos, J.L., 2005. 16S rDNA phylogeny and distribution of lin genes in novel hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas* strains. *Environ. Microbiol.* 7, 1329–1338.
- Bradshaw, A.D., Hardwick, K., 1989. Evolution and stress—genotype and phenotype components. *Biol. J. Linnean Soc.* 37, 137–155.
- Breivik, K., Pacyna, J.M., Münch, J., 1999. Use of alpha-, beta- and gamma-hexachlorocyclohexane in Europe, 1970–1996. *Sci. Total Environ.* 239, 151–163.
- Chaudhary, P., Kumar, M., Khangarot, B.S., Kumar, A., 2006. Degradation and detoxification of hexachlorocyclohexane isomers by *Pseudomonas aeruginosa* ITRC-5. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 57, 107–113.
- Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Agrelo, M., García-Villada, L., Juste, J., López-Rodas, V., 2001. Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea herbicide. *Phycologia* 40, 391–398.
- Costas, E., Flores-Moya, A., Perdigones, N., Maneiro, E., Blanco, J.L., García, M.E., López-Rodas, V., 2007. How eukaryotic algae can adapt to Spain's Rio Tinto: a neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *New Phytol.* 175, 334–339.
- Costas, E., Flores-Moya, A., López-Rodas, V., 2008. Rapid adaptation of algae to extreme environments (geothermal waters) by single mutation allows Noah's Arks for photosynthesizers during the Neoproterozoic snowball Earth? *New Phytol.* 189, 922–932.
- Crow, J.F., Kimura, M., 1970. An introduction to population genetics theory. Harper & Row, New York, NY, USA, p. 591.
- El-Bestawy, E.A., Abd El-Salam, A.Z., Mansy, A.E.H., 2007. Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 59, 180–192.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A., 1997. Aquatic photosynthesis. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, UK, p. 375.
- Flores-Moya, A., Costas, E., Bañares-España, E., García-Villada, L., Altamirano, M., López-Rodas, V., 2005. Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphurous waters) through pre-selective mutations. *New Phytol.* 166, 655–661.
- Fogg, G.E., 2001. Algal adaptation to stress, some general remarks. In: Rai, L.C., Gaur, J.P. (Eds.), *Algal Adaptation to Environmental Stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Springer, Berlin, Germany, pp. 1–20.
- Fragoero, S., Magan, N., 2005. Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environ. Microbiol.* 7, 348–355.
- García-Villada, L., López-Rodas, V., Bañares, E., Flores-Moya, A., Costas, E., 2002. Evolution of microalgae in highly stressing environments: an experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by rare pre-selective mutation. *J. Phycol.* 38, 1074–1081.
- García-Villada, L., Rico, M., Altamirano, M., Sánchez, L., López-Rodas, V., Costas, E., 2004. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulphate as algicide. *Water Res.* 38, 2207–2213.
- Gupta, A., Kaushik, C.P., Kaushik, A., 2000. Degradation of hexachlorocyclohexane (HCH; a, b, g and d) by *Bacillus circulans* and *Bacillus brevis* isolated from soil contaminated with HCH. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1803–1805.
- Hansen, P., 1979. Experiments on the accumulation of lindane ((-)-BCH) by the primary producers *Chlorella spec.* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 8, 721–731.
- Iannaccone, J., Gutiérrez, A., 1999. Ecotoxicity of agrochemicals lindane and chlorpyrifos on the nematode *Panagrellus*, the microalgae *Chlorella* and the *Allium*-test. *Agric. Técnica* 59 (2), 85–95.
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquat. Toxicol.* 76, 93–110.
- Kimura, M., Maruyama, T., 1966. The mutational load with epistatic gene interactions in fitness. *Genetics* 54, 1337–1351.
- Kirk, J.T.O., 1994. Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems, second ed. Cambridge University Press, New York, NY, USA, p. 256.
- Kobayashi, H., Rittmann, B.E., 1982. Microbial removal of hazardous organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 16, 170A–183A.
- Kumar, M., Chaudhary, P., Dwivedi, M., Kumar, R., Paul, D., Jain, R.K., Garg, S.K., Kumar, A., 2005. Enhanced biodegradation of band d-hexachlorocyclohexane in the presence of a- and g-isomers in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4005–4011.
- Lal, R., Pandey, G., Sharma, P., Kumari, K., Malhotra, S., Pandey, R., Raina, V., Kohler, H.P.E., Holliger, C., Jackson, C., Oakeshott, J.G., 2010. Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 58–80.
- Li, Y.F., 1999. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *Sci. Total Environ.* 232, 121–158.
- Luria, S., Delbrück, M., 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28, 491–511.
- López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Larrauri, A., Martín-Otero, L., Costas, E., 2001. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur. J. Phycol.* 36, 179–190.
- López-Rodas, V., Flores-Moya, A., Maneiro, E., Perdigones, N., Marva, F., García, M.E., Costas, E., 2007. Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as a result of preselective mutations. *Evol. Ecol.* 21, 535–547.
- López-Rodas, V., Marva, F., Costas, E., Flores-Moya, A., 2008a. Microalgal adaptation in the stressful acidic, metal-rich mine waters from Mynydd Parys (N Wales, UK) could be due to selection of preselective mutants. *Environ. Exp. Bot.* 61, 43–48.
- López-Rodas, V., Marva, F., Rouco, M., Costas, E., Flores-Moya, A., 2008b. Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to the stressful acidic, mine metal-rich waters from Aguas Agrias Stream (SWSpain) as result of pre-selective mutations. *Chemosphere* 72, 703–707.
- López-Rodas, V., Carrera-Martínez, D., Salgado, E., Mateos-Sanz, A., Baez, J.C., Costas, E., 2009a. A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in Arroyo Minero, Río Negro, Argentina. *An. Real Acad. Farm.* 75, 883–899.
- López-Rodas, V., Perdigones, N., Marva, F., Maneiro, E., Rouco, M., Delgado, A., Flores-Moya, A., Costas, E., 2009b. Living in Vulcan's forge: algal adaptation to stressful geothermal ponds on Vulcano Island (southern Italy) as result of pre-selective mutation. *Phycol. Res.* 57, 111–117.

- Macedo, R.S., Lombardi, A.T., Omachi, C.Y., Röhrig, L.R., 2008. Effects of the herbicide bentazon on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Toxicol. In Vitro* 22, 716–722.
- Manonmani, H.K., Chandrashekariah, D.H., Sreedhar Reddy, N., Elcay, C.D., Kunhi, A.A.M., 2000. Isolation and acclimation of a microbial consortium for improved aerobic degradation of α -hexachlorocyclohexane. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4341–4351.
- Miglioranza, K.S.B., Sagrario, M., Moreno, J.E.A., Moreno, V.J., Escalante, A.H., Osterrieth, M.L., 2002. Agricultural soil as a potential source of input of organochlorine pesticides into a nearby pond. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9, 250–256.
- Myers, N., Knoll, A.H., 2001. The biotic crisis and the future of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5389–5392.
- Okeke, B.C., Siddique, T., Arbestain, M.C., Frankenberger, W.T., 2002. Biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane (lindane) and α -hexachlorocyclohexane in water and a soil slurry by a *Padora* species. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2548–2555.
- Palumbi, S.R., 2001. Human as world's greatest evolutionary force. *Science* 293, 1786–1790.
- Phillips, T.M., Seech, A.G., Lee, H., Trevors, J.T., 2005. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation* 16, 363–392.
- Franciskovic-Bilinski, S., Bilinski, H., Sirac, S., 2005. Organic pollutants in stream sediments of Kupa River drainage basin. *Fresenius Environ. Bull.* 14, 282–290.
- Rigas, F., Papadopolou, K., Dritsa, V., Doulia, D., 2007. Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology. *J. Hazard. Mater.* 140, 325–332.
- Sager, R., 1954. Mendelian and non-mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 40, 356–363.
- Sager, R., 1962. Streptomycin as a mutagen for nonchromosomal genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 2018–2026.
- Sager, R., 1977. Genetic analysis of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Adv. Genet.* 19, 287–340.
- Sager, R., 1985. Chloroplast genetics. *Bioessays* 3, 180–184.
- Semple, K.T., Cain, R.B., Schimdt, S., 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 291–300.
- Singh, B.K., Kuhad, R.C., Singh, A., Tripathi, K.K., Ghosh, P.K., 2000. Microbial degradation of the pesticide lindane (γ -hexachlorocyclohexane). *Adv. Appl. Microbiol.* 47, 269–298.
- Sniegowski, P.D., Lenski, R.E., 1995. Mutation and adaptation: the directed mutation controversy in evolutionary perspective. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 26, 553–578.
- Sniegowski, P.D., 2005. Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. *New Phytol.* 166, 360–362.
- Spies, E.B., 1989. *Genes in Populations*, second ed. John Wiley, New York, NY, USA.
- Tanabe, S., Subramanian, A.N., Ramesh, A., Kumaran, P.L., Miyazaki, N., Tatsukawa, R., 1993. Persistent organochlorine residues in dolphins from the Bay of Bengal, south India. *Mar. Pollut. Bull.* 26, 311–316.
- Tao, S., Xu, F.L., Wang, X.J., Liu, W.X., Gong, Z.M., Fang, J.Y., Zhu, L.Z., Luo, Y.M., 2005. Organochlorine pesticides in agricultural soil and vegetables from Tianjin, China. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2494–2499.
- Tejomayee, S.B., Puranik, P.R., 2007. Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 59, 315–321.
- Thomas, J.C., Berger, F., Jacquier, M., Bernillon, D., Baud-Grasset, F., Truffaut, N., Normand, P., Vogel, T.M., Simonet, P., 1996. Isolation and characterization of a novel gamma-hexachlorocyclohexanedegrading bacterium. *J. Bacteriol.* 178, 6049–6055.
- van Eekert, M.H., Van Ras, N.J.P., Mentink, G.H., Rijnaarts, H.H.M., Stams, A.J.M., Field, J.A., Schraa, G., 1998. Anaerobic transformation of γ -hexachlorocyclohexane by methanogenic granular sludge and soil microflora. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3299–3304.
- Thrusfield, M., 1995. *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Science, New York.
- Vijgen, J., Yi, L.F., Forter, M., Lal, R., Weber, R., 2006. The legacy of lindane and technical HCH production. *Organohalog. Compd.* 68, 899–904.
- van Doesburg, W., van Eekert, M.H., Middeldorp, P.J., Balk, M., Schraa, G., Stams, A.J., 2005. Reductive dechlorination of beta-hexachlorocyclohexane (beta-HCH) by a *Dehalobacter* species in coculture with a *Sedimentibacter* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 87–95.
- Waliszewski, S.M., Carvajal, O., Infanzon, R.M., Trujillo, P., Aguirre, A.A., Maxwell, M., 2004. Levels of organochlorine pesticides in soils and rye plant tissues in a field study. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7045–7050.
- Woodruff, D.S., 2001. Declines of biomes and biotas and the future of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5471–5476.

- **The ignored stowaways: worldwide dispersion of exotic microalgae species through the biofouling recovering the ships underwater body**

Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, 76 (2010) 189-208

ARTÍCULO

The ignored stowaways: worldwide dispersion of exotic microalgae species through the biofouling recovering the ships underwater body

Victoria López-Rodas^{1,2}, Raquel González¹, Eduardo Costas^{1,2*}

¹ Departamento de Genética (Producción Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040. Madrid (Spain).

² AlgasGen Biotecnología EBT-UCM. Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040. Madrid (Spain).

Recibido el 13 de abril de 2010.

ABSTRACT

Invasion by introduced species cause huge environmental damage and economic (estimated in \$138 billion in USA). Marine ecosystems are specially affected by introduced species of toxin-producing microalgae. Ships ballast water has been considered the major vector in dispersion of phytoplankton. However, most ships do not use ballast water. Alternatively, we propose that the biofouling recovering the underwater body of ships is the main cause of microalgal dispersion. Antifouling paints (containing tributyltin, TBT or other toxics) are used to coat the bottoms of ships to prevent biofouling. After sampling biofouling recovering the underwater body of ships we demonstrate that numerous coastal, oceanic and toxin-producing microalgae species proliferates attached on bottoms of ships directly on TBT antifouling paint. These microalgae species should be resistant variants because antifouling paints rapidly destroy sensitive wild type microalgae. Consequently, the key to explain microalgae

species transport via ships biofouling is know the mechanisms that allow to these species to survive long time attached to antifouling paint. A fluctuation analysis demonstrate that genetic adaptation by rare spontaneous mutation, which occurs by chance prior to antifouling exposure is the mechanism allowing adaptation of microalgae to antifoulig paints and their dispersion in the ships biofouling. Around 3 TBT-resistant mutants per each 10^{-4} wild type sensitive cells occurs in microalgal population. This assures a rapid colonization of ships bottoms to travel long-distances.

Key words: Adaptation; Biofouling; HABs; Harmful algae; Introduced species; TBT.

RESUMEN

Los polizones ignorados: dispersión por el mundo de las especies de microalgas exóticas mediante el «biofouling» que recubre el fondo de los barcos

La introducción de especies invasoras puede causar grandes problemas medioambientales y económicos (estimados en 138 billones de \$ en USA). Los ecosistemas marinos se ven especialmente afectados por la introducción de microalgas tóxicas. El agua de lastre de los barcos está considerada como el mayor vector de dispersión de fitoplancton. Sin embargo, la mayoría de los barcos no tienen lastre de agua. Como alternativa, proponemos que el biofouling que recubre los barcos es la principal causa de dispersión de microalgas. Se utilizan pinturas antifouling (conteniendo tributil-estaño, TBT u otros tóxicos) para recubrir la obra viva de los barcos previniendo el biofouling. Despues de diversos muestreos de la obra viva en barcos demostramos que numerosas especies de microalgas costeras, oceánicas y productoras de toxinas son capaces de proliferar adheridas a la obra viva de los barcos, directamente sobre la pintura TBT antifouling. Estas microalgas deben ser variantes resistentes porque el TBT rápidamente destruye las microalgas sensibles. Consecuentemente, la clave para explicar el transporte de las especies de microalgas en el biofouling de los barcos es conocer los mecanismos que permiten a las especies sobrevivir mucho tiempo sobre la pintura

antifouling. Un análisis de fluctuación ha demostrado que la adaptación genética debida a raras mutaciones espontáneas, que ocurren anteriormente a la exposición al TBT, es el mecanismo que le permite a las microalgas adaptarse a la pintura antifouling y su posterior dispersión en el biofouling. Hay alrededor de tres mutantes resistentes al TBT por cada 10^{-4} células sensibles en la población. Esto asegura la rápida colonización de la obra viva de los barcos para viajar largas distancias.

Palabras clave: Adaptación; Biofouling; HABs; Algas tóxicas; Especies introducidas; TBT.

1. INTRODUCTION

Numerous introduced species (also called exotic, non-indigenous, or alien species) proliferates worldwide outside its native distributional range usually as a consequence of human activities. Invasion by introduced species can change the functions of ecosystems causing unpredictable emergent novelties, environmental damage and loss in biodiversity (1). Economic cost assigned to introduced species in USA was estimated in \$138 billion (2).

Marine ecosystems are specially affected by introduced species (3). As an example, the introduced algae *Caulerpa taxifolia* represents a major risk for sublittoral Mediterranean ecosystems (4, 5). Invasion of toxin producing phytoplankton is particularly worrisome because of their potentially devastating impacts on aquaculture, fishery and public health (6-8). Ballast water has been considered the major vector by which (mainly phytoplankton) have invaded ecosystems worldwide where they did not previously occur (9-14). Consequently, biocide treatments and other management strategies are carried out in ballast water to minimize introduction of alien species (15, 16).

The hypothesis of ballast water as mechanisms of dispersion of marine organisms is attractive. However, few ships (mainly tankers and containers) used ballast water (17). Most ships (including recreational yachts) do not use ballast water. In contrast, any boat or ship afloat has an underwater body that can be rapidly colonized by thousands of marine species of algae, crustacean and mollusc attaching themselves to the hull forming a dense biofouling.

We propose that the biofouling recovering the underwater body of ships is a source to disperse algal species, which contributes to bio-invasion by alien species at least as efficiently as ballast water.

However, antifouling paints are widely used to coat the bottoms of ships to prevent biofouling. During the 1960s the chemical industry developed efficacious anti-fouling paints using metallic compounds in particular the organotin compounds tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) (reviewed in 18). TBT and TPT are very toxic for algae, crustacean and molluscs. These organotin compounds have been extensively used in ships worldwide. Although some countries recently banned TBT and TPT (19, 20), the alternative antifouling paints are also based on other toxic compounds such as copper salts (20).

In this work we demonstrate that: i) numerous species of microalgae travel great distances forming the biofouling recovering the underwater body of ships, ii) these microalgal species are resistant to anti-fouling paints, and iii) the antifouling paint-resistant microalgae arose by rare spontaneous mutation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sampling of biofouling recovering the underwater body of ships

Microbiological hyssops were scraped against the TBT-antifouling paint of boats that arriving to Sagunto Port, Valencia, Spain after large oceanic journeys (i.e. From Africa, America). The hyssops were immersed in culture flaks (Greiner, Bio-One Inc., Longwood NJ, USA) with 20 ml of BG-11 medium (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), and stored at 15 °C in darkness until laboratory identification of microalgae species. Microalgae were identified in fresh samples using settling chambers under and inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.2. Experimental organism

Laboratory experiments were performed with the unicellular *Chlorophyta* (strain *Dc1M*), from the Algal Culture Collection of the Universidad Complutense (Madrid). The strain was grown axenically in cell culture flasks (Greiner, Bio-One Inc., Longwood, NJ, USA) with 20 ml of Sigma algal culture medium (Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), at 20° C under continuous light of 60 mol photon m⁻² s⁻¹ over the waveband 400-700 nm. It was maintained in mid-long exponential growth by serials transfers of a cell inoculum to fresh medium (once every month). Prior to the experiments, the cultures were re-cloned (by isolating a single cell) to avoid including any previous spontaneous mutants accumulated in the cultures. Cultures were maintained as axenic as possible and only cultures without detectable bacteria were used in the experiments.

2.3. Toxicity test: effect of TBT on growth rate and photosynthesis performance

A stock solution of TBT (Sigma) was prepared in BG-11 medium to obtain serial dilutions of 0, 1, 3, 10, and 30 ppm. Each experimental culture was inoculated with 6×10^6 cells from mid-log exponentially growing cultures. Two replicates of each concentration of TBT, as well as two unexposed controls, were prepared.

The toxic effect of the TBT was estimated by calculating acclimated maximal growth rate (μ) in mid-log exponentially growing cells, derived from the equation:

$$N_t = N_0 e^{\mu t} \quad (21)$$

where $t = 7$ days, the time that cultures were exposed to different dose of TBT, and N_t and N_0 are the cell numbers at the end and at the start of the experiment, respectively. Experiments and controls were counted blind (i.e., the person counting the test did not know the identity of the tested sample), using a Uriglass settling chamber (Bio-siga, Cona, Italy) and an inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss).

The effective quantum yield (Φ PSII) was also measured in triplicates of experiments and controls of both species using a ToxY-

PAM fluorimeter (Walz, Effeltrich, Germany) at seven different time points (0.1, 1, 10, 12, 24, 48 and 72 h). Effective quantum yield was calculated as follows:

$$\Phi \text{ PSII} = (F'_m - F_t) / F'_m \quad (22)$$

F'_m , F_t , maximum and steady-state fluorescence of light-adapted cells, respectively.

2.4. Fluctuation analysis of TBT-sensitive \rightarrow TBT-resistant transformation

A modified Luria-Delbruck fluctuation analysis (23) was performed to distinguish resistant cells that had their origin in random spontaneous pre-selective mutations (mainly prior to TBT exposure) from those arising through acquired post-selective adaptation (during the exposure to TBT) (Figure 1). Two different sets of experimental cultures were prepared. In the set 1 experiment, 96 culture flasks were inoculated with $N_0 = 10^2$ cells (a number small enough to reasonably ensure the absence of pre-existing mutants in the strain). Cultures were grown in BG-11 medium until $Nt = 1 \times 10^5$ cells and afterwards exposed to TBT. For the set 2 controls, 26 aliquots of 1×10^5 cells from the same parental population growing in BG-11 medium were separately transferred to culture flasks containing TBT. Cultures were observed for 60 d (thereby insuring that one mutant cell could generate enough progeny to be detected), and the resistant cells in each culture (in set 1 and set 2) were counted. The cell count was performed by at least two independent observers.

Two different results can be found in the set 1 experiment, each of them being interpreted as the independent consequence of two different phenomena of adaptation. In the first case (Figure 1, set 1A), the variance in the number of cells per culture could be found to be low if resistant cells arose by physiological adaptation or specific post-selective mutations. Because every cell is likely to have the same chance of developing resistance, inter-culture (flask-to-flask) variation would be consistent with the Poisson model (variance/mean = 1). On the contrary, if high variation in the inter-

culture number of resistant cells is found (variance/mean > 1), it means that resistant cells appeared by random mutations occurring before selection, and the flask-to-flask variation would not be consistent with the Poisson model. Resistant-mutants occurred during the time in which the cultures reached N_t from N_0 cells, prior to TBT exposure (Figure 1, set 1B). The set 2 cultures serve as the experimental control of the fluctuation analysis (Figure 1). Variance is expected to be low, because set 2 samples the variance of the parental population. Thus, if a similar variance/mean ratio between set 1 and set 2 is found, resistant cells arose induced during the exposure to the TBT. If the variance/mean ratio of set 1 is significantly greater than the variance/mean ratio of set 2 (fluctuation), resistant cells arose by rare mutations that occurred before exposure to the TBT.

The fluctuation analysis also allows estimation of the rate of appearance of resistant cells. The proportion of set 1 cultures showing non-resistant cells after TBT exposure (P_0 estimator) was used to calculate the mutation rate (μ) as follows:

$$P_0 = e^{-\mu (N_t - N_0)} \quad (23)$$

where P_0 is the proportion of cultures showing no resistant cells, N_0 and N_t are the initial and the final cell number respectively and μ is the mutation rates (in mutants per cell division).

If the mutation from a normal wild-type TBT-sensitive allele to a TBT-resistant allele is recurrent, and the TBT-resistant allele is detrimental to fitness in the absence of TBT, then new mutants arise in each generation, but most of these mutants are eliminated sooner or later by natural selection, if not by chance (21). At any one time there will be a certain number of resistant mutants that are not yet eliminated. The balance between μ and the rate of selective elimination (s) will determine the average number of such mutants:

$$q = \mu / (\mu + s) \quad (24)$$

where q is the frequency of the TBT-resistant allele and s is the coefficient of selection against TBT-resistant allele calculated as follows:

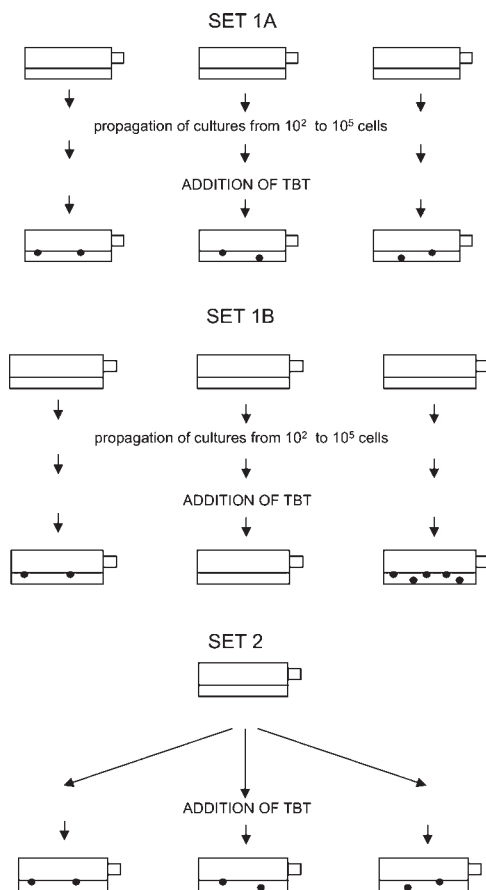


Figure 1. Schematic diagram of possible results obtained in the experiment (modified from the classic Luria-Delbrück fluctuation analysis). In the set 1 experiment, 100 different cultures of *Dc1M* strain (each started from inoculums of $N_0 = 10^2$ cells) were propagated under non-selective conditions (i.e. without TBT) until a very high cell density ($N_t = 10^5$ cells) was reached, and then TBT was added. **Set 1A:** the resistant cells arose in response to TBT during TBT exposure. In this case, the number of resistant cells in all the cultures must be similar. **Set 1B:** the resistant cells arose by rare spontaneous mutations. Most of these mutations spontaneously arose during the period of the propagation of cultures before to TBT exposure. One mutational event occurred late in the propagation of culture 1 (therefore, the density of TBT-resistant cells found is low) and early in the propagation of culture 3 (thus, density of TBT-resistant cells found is higher than in culture 1); no mutational events occurred in culture 2. In this case, the number of resistant cells in all the cultures must be different. **Set 2** samples the variance of parental populations as an experimental control. In this case, the number of resistant cells in all the cultures must be similar.

$$s = 1 - (m_{TBT}^r / m_{TBT}^s)$$

where m_{TBT}^r and m_{TBT}^s are the Malthusian fitness of TBT-resistant and TBT-sensitive cells measured in non-selective conditions (i.e. BG-11 medium), respectively.

2.5. Growth of TBT-sensitive and TBT-resistant cells on antifouling paint

Bottom of 6 wells-dish plates (Nunc Delta Surface, Denmark) was painted with TBT- antifouling paint (Hempel, Polinya, Barcelona, Spain). Twenty-four hours latter, cell inoculums of 5×10^5 wild type TBT-sensitive cells or TBT-resistant mutants were respectively transferred to antifouling-painted plates with 10 ml of BG-11 fresh medium. Three plates of sensitive and three plates of resistant cells were maintained at 20° C under continuous light of 60 mol photon $m^{-2} s^{-1}$ over the waveband 400-700 nm. Cultures were observed for 15 days and the final number of cells was counted using a Uriglass chambers and an inverted microscope (Zeiss Axiovert 35).

3. RESULTS

3.1. Microalgae of biofouling recovering the underwater body of ships

Numerous coastal and oceanic microalgae species proliferates on bottoms of ships directly on TBT antifouling paint (Figure 2). Most abundant species were: i) diatoms (Bacillariophyta) from genus *Navicula*, *Nitzschia*, *Asterionella*, *Amphora*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira* and *Rhizosolenia*; ii) Dinoflagellates from genus *Prorocentrum*, *Scrippsiella* and *Amphidinium*; iii) Haptophyta from genus *Primnesium* and *Chrysochromulina*; iv) Chlorophyta from genus *Tetraselmis* and *Dunaliella*; v) cyanobacteria (Cyanophyta) from genus *Synechococcus*; vi) Chloroxibacteria from genus *Prochloron*. These microalgae were viable in spite of their contact with the antifouling paint. In addition, resting phases (i.e. dinoflagellates cyst, diatom spores) and early stages of macroalgae (i.e. *Fucus*, *Laminaria*, *Chondrus*, *Codium* and others) were also observed.

Toxin-producing microalgae (i.e. okadaic acid producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*; domoic acid producing diatom *Pseudonitzschia pungens*) and other harmful microalgae (i.e. *Crysochromulina*) were also found attached to the bottoms of the sampled ships.

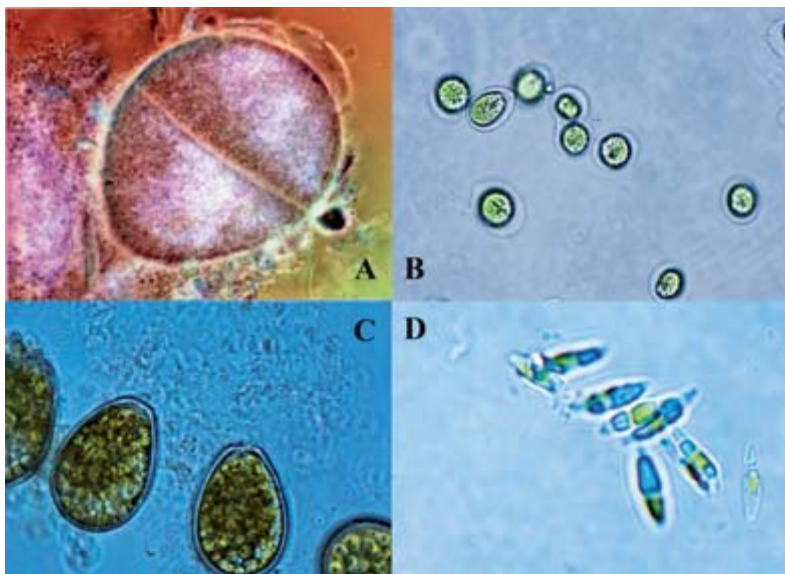


Figure 2. Example of algae of biofouling recovering the underwater body of ships. **A.** Early stage of *Fucus* (Phaeophyta); **B.** *Tetraselmis* sp. (Chlorophyta); **C.** DSP toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (okadaic acid producing); **D.** pennate diatoms (*Pseudonitzschia* sp.).

3.2. Toxic effect of TBT on cells of Dc1M

TBT was extremely toxic for *Dc1M* cells of wild-type genotype. Growth of *Dc1M* cells was irreversibly inhibited by TBT concentrations of 10 ppm. Monitoring changes in photosynthetic performance also assessed the toxic effect of TBT. Only 10 ppm TBT were able to inhibit 79,51% of Φ_{PSII} whereas 30 ppm TBT totally inhibited photosynthesis.

3.3. Fluctuation analysis

When conducting the fluctuation analysis, the cell density of strain *Dc1* was drastically reduced in each experimental culture due to destruction of wild-type cells, by the toxic effect of TBT. However, after further incubation for 60 days, some cultures increased in density again, apparently due to growth of a TBT-resistant variant.

In the case of set 1, only some cultures recovered after 60 days under TBT exposure (Table 1). By contrast, every set 2 culture recovered, indicating the presence of TBT-resistant cells in all cultures. A high fluctuation (variation) in the set 1 experiment (from 0 to more than 10⁵ resistant cells per culture flask) was found (Table 1). In contrast, in set 2 controls all the culture flaks showed from 10⁴ to 10⁵ TBT-resistant cells (a scarce variation due to experimental error), which indicated that the high fluctuation found in set 1 cultures should be due to processes other than sampling error. The fluctuation of set 1 experiment indicates that TBT-resistant cells arose by rare, pre-selective spontaneous mutations rather than by specific adaptation in response to TBT.

Table 1. Fluctuation analysis from TBT-sensitivity to TBT-resistance in *Dc1M* strain

	Set 1 experiments	Set 2 controls
No. of replicate cultures	96	26
No. of cultures containing the following no. of TBT resistant cells:		
0	65	0
from 1 to 10 ³	5	0
from 10 ³ to 10 ⁴	7	0
from 10 ⁴ to 10 ⁵	8	26
more than 10 ⁵	11	0
Fluctuation		yes
μ (mutants per cell per generation)		7.071 × 10 ⁻⁸

The estimated mutation rate (μ) from TBT-sensitivity to TBT-resistance in *Dc1M* strain was 7.07 × 10⁻⁸ mutants per cell per cell

division. The Malthusian parameter of fitness of TBT-resistant mutants and wild type sensitive cells (0.085 and 0.24 respectively) were used to estimate the coefficient of selection of TBT-resistant mutants (s). By using the values of m and s , the frequency (q) of resistant alleles was estimated in *circa* 3 TBT-resistant mutants per 10^{-4} wild type sensitive cells.

3.4. Growth of TBT-sensitive and TBT-resistant cells on antifouling paint

When wild type sensitive *Dc1M* cells were grown during 15 days on antifouling paint in Nunclon wells-dish plates a massive destruction of cells was observed. Antifouling paint totally inhibited the cell growth and most of the cells were destroyed (initial no. = 5.0×10^5 cells ml^{-1} ; final no. = 1.6×10^5 cells ml^{-1}). In contrast TBT-resistant mutants were able to grow directly on antifouling paint (initial no. = 5.0×10^5 cells ml^{-1} ; final no. = 1.5×10^6 cells ml^{-1}).

4. DISCUSSION

Numerous microalgae were found in the biofouling recovering the underwater body of ships. As expected pennate diatom species, which can easily be attached to surfaces by mucilage secretions (25) are very numerous. Also benthic dinoflagellates are abundant in the ships biofouling. Obviously, early stages of macroalgae easily colonize biofouling.

A lot of resting stages of phytoplankton (cysts and spores) were found in the biofouling. These resting phases seems to be especially well adapted to survive in the biofouling. Since most phytoplanktonic organisms has spores and resting cysts that serve as a perennation function (25), i.e. they allow phytoplankton to survive periods that are not suitable for growth and afterwards germinate when conditions improve, biofouling is a potential source for microalgae dispersion.

Apparently, several species detected on ships biofouling could be exotic species. Taken in account that different families of clones

maintained by asexual growth constitute the population genetic structure of many phytoplankton species (26), also exotic genotypes could arrive to far regions via biofouling. Some of these non-indigenous introduced species or genotypes could proliferate in remote areas and become invasive species.

Long-distance transport of toxin-producing microalgae it is particularly worrisome. Three harmful microalgae species (*Prorocentrum lima*, *Pseudonitzschia pungens* and *Crysochromulina polylepis* implicated in DSP, ASP and mass mortalities of fish respectively) were detected in a small area (less of 3 cm²) of biofouling in one boat. This provides robust evidence on the magnitude of biofouling-associated transport problem. During the 1950s Margalef (one of the best phytoplankton taxonomists) analyzed the microalgae species composition in the Ría de Vigo, NW of Spain, (27-29) providing extensive list of phytoplankton species composition. However, Margalef never detected several microalgae species that constitutes the main problem of harmful algal blooms (HABs) in the Ría de Vigo nowadays. Could have arrived recently these algae to Ría of Vigo via ships biofouling? Since Ría of Vigo with other Rías of NW of Spain (i.e. Pontevedra, Arosa, Muros and Lorbé) is the most important area for shellfish aquaculture in European Union (i.e. mussels, cockles, oysters, clams and scallops) the economic impact of HABs species introduction of could be enormous.

The key to explain microalgae species transport via ships biofouling is know the mechanisms that allow to these species to survive long time attached to antifouling paint. Apparently, adaptation to biofouling paints is not easy. Growth and photosynthetic performance of the experimental strain *Dc1M* was irreversibly inhibited by TBT concentrations many times lower than those used in antifouling paints. Antifouling paint on the bottom of Nunclon wells-dish plates rapidly destroyed wild type *Dc1M* cells. Since adaptation to antifouling paints seems to be difficult, the classic evolutionary point of view assumes that genetic adaptation at such extreme conditions is a gradual process (reviewed in 30).

In contrast, here we propose an alternative explanation for adaptation of microalgae to antifouling paints. When the experimental strain *Dc1M* was cultured in TBT, usually cultures show massive destruction of the sensitive cells by the toxic effect of TBT. However,

after further incubation for 60 days, some cultures became increased in density again, due to the growth of cells that were resistant to the toxic effect of TBT.

The approach for understanding adaptation of microalgae to TBT is to analyze the rare variants that proliferate after the massive destruction of the sensitive cells by this selective agent. Fluctuation analysis is the appropriate procedure to discriminate between TBT-resistant cells arising by rare spontaneous mutations occurring randomly during replication of organisms prior to exposure to TBT and TBT-resistant cells arising through specifically acquired adaptation induced by TBT (reviewed in 31).

Genetic adaptation by rare spontaneous mutation is the mechanism allowing adaptation of microalgae to TBT contamination. The large fluctuation in number of resistant cells detected in the set 1 experiment in contrast to the scarce fluctuation in set 2 controls, unequivocally demonstrates that these resistant cells arose by rare spontaneous single mutations (which mainly occur prior to TBT exposure) and not through direct and specific adaptation in response to TBT. Results of fluctuation suggest that only one gene is implicated in the TBT-resistance process. If several genes are involved in TBT resistance then we should be unable to detect TBT-resistant cells growing in flasks of set 1 experiment because the scarce probability of occurrence for several mutations at the same time. Consequently, microalgae can adapt to antifouling paints much more rapidly by single mutations than if the ability to survive requires multiple mutations. Several evidences suggest that single spontaneous mutation at one locus can achieve adaptation of mesophile microalgae to other severe anthropogenic contaminants including antibiotics (32, 33), herbicides (34-36) other potent biocides (37), and crude oil (38, 39). Even, microalgae are able to rapid adaptation to heavy metals (which are the toxic compounds of antifouling paints) by means of single pre-selective mutations (40-43). Resistant mutants of microalgae are usually used to manufacture specific biosensors (44, 45). This capability is perhaps a consequence of microalgae ability for adaptation to hostile natural environments by mechanisms based on single mutations (46-50).

The *DcM1* strain was widely used to measure mutation rates from sensitivity to resistance to several anthropogenic and natural

contaminants (summarized in Table 2). A remarkable feature was that mutation rate from TBT-sensitivity to TBT-resistance ($\mu = 7.07 \times 10^{-8}$ mutants per cell per cell division) was two or three orders of magnitude lower than those we have described for resistance to other biocides in *Dc1M* strain. It may be that the acquisition of TBT-resistance exemplified by the present work is intrinsically more rare than other kinds of mutation. However, this aspect remains to be investigated.

Table 2. Mutation rates (μ) in mutants per cell division of *Dc1M* strain from sensibility to resistance against different lethal anthropogenic and natural contaminants

Selective agent	μ	source
TBT	7.07×10^{-8}	this paper
DCMU	2.1×10^{-6}	Costas <i>et al.</i> (2001) (34)
TNT	1.4×10^{-5}	García-Villada <i>et al.</i> (2002) (37)
Formaldehyde	3.6×10^{-6}	López-Rodas <i>et al.</i> (2008c)
Tinto River	1.4×10^{-6}	Costas <i>et al.</i> (2007) (49)
Geothermal waters	1.4×10^{-6} to 1.5×10^{-5}	Costas <i>et al.</i> (2008) (47)
Mynydd Parys pond	1.6×10^{-6}	López-Rodas <i>et al.</i> (2008a) (43)
Aguas Agrias stream	1.1×10^{-6}	López-Rodas <i>et al.</i> (2008b) (48)
Vulcano Island pond	4.7×10^{-7}	López-Rodas <i>et al.</i> (2009) (46)

Mutation from TBT-sensitivity to TBT-resistance occurs recurrently. However, TBT-resistant cells have diminished fitness compared to wild type TBT-sensitive cells. Consequently, the balance between the recurrent appearance of mutants by rare pre-selective mutation and their elimination by natural selection controls the presence of TBT-resistant cells in the populations. As a result, an equilibrium frequency of around 3 TBT-resistant mutants per each 10^{-4} wild type sensitive cells should maintain in *Dc1M* algal populations non-exposed to TBT. Taking into account both the relatively high number of resistance-mutants and the countless cells comprising algal populations, it could be hypothesized that algal colonization of antifouling paints should be almost instantaneous because TBT-resistant cells are always present in microalgae

populations. The experiment of colonization of Nunclon wells-dish plates painted with antifouling demonstrates validity of this hypothesis.

Long-distances navigation is a characteristic of human civilizations. A lot of microalgae stowaways invade the underwater body of our ships to disperse worldwide. Since microalgal toxins are among the most important emerging health risk due to shellfish consumption (51-53) introduced toxic microalgal species are an important menace.

5. CONCLUSION

1. Marine ecosystems are specially affected by toxin-producing introduced species of microalgae with devastating impacts on aquaculture, fishery, tourism and public health (economic cost estimated in \$ billions). Although ships ballast water has been considered the major vector in dispersion of microalgae, numerous species of microalgae travel great distances forming the biofouling attached the underwater body of ships.
2. In spite of toxic antifouling paints recovering the bottom of ships microalgal species are resistant to these antifouling.
3. Antifouling paint-resistant microalgae arose by rare mutation, which occurs spontaneously in natural populations prior to antifouling paint exposure. The balance between the recurrent appearance of antifouling-resistant mutants and their elimination by natural selection controls the presence of antifouling-resistant cells in the natural populations. An equilibrium frequency estimated in around 3 antifouling resistant mutants per each 10^{-4} sensitive cells should assure a rapid microalgal colonization of the underwater body of ships.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks are given to Carmen Romero by micrographs and Lara de Miguel by technical support. Supported by Grants CTM2008-05680-C02-02 and CGL2008-00652/BOS (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain).

7. REFERENCES

1. Myers, N. & Knoll, A. H. (2001) The biotic crisis and the future of evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 98: 5471-5476.
2. Pimentel, D.; Zuniga, R. & Morrison, D. (2005) Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecol. Econom.* 52: 273-288.
3. Naylor, R. L.; Williams, S. L. & Strong, D. R. (2001) Aquaculture-a gateway for exotic species. *Science*. 294: 1655-1656.
4. Bellan-Santini, D.; Arnaud P. M.; Bellan, G. & Verlaque, M. (1996) The influence of the introduced tropical alga *Caulerpa taxifolia*, on the biodiversity of the Mediterranean marine biota. *J. Marine Biological Association of the United Kingdom*. 76(1): 235-237.
5. Meinesz, A. (1999) *Killer Algae: A True Tale of Biological Invasion*. Univ. Chicago Press. 360 pp.
6. Subba Rao, D. V.; Sprules, W. G.; Locke, A. & Carlton, J. T. (1994) Exotic phytoplankton from ships' ballast water treatment system: Risk of potential spread to mariculture sites on Canada's East Coast. *Canadian Data Report of fisheries and Aquatic Sciences*. 937: 51.
7. Hallegraeef, G. M. (1998) Transport of toxic dinoflagellates via ships' ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 168: 297-309.
8. Keun-Hyung, C. (2009) Risk assessment of ballasted water-mediated invasion of phytoplankton: a modelling study. *Ocean Sci. J.* 44: 221-226.
9. Hallegraeef, G. M. & Bolch, C. J. (1991) Transport of toxic dinoflagellates cysts via ships' ballast water. *Mar. Pollut. Bull.* 22: 27-30.
10. Gollasch, S.; Dammer, M.; Lenz, J. & Andres, H. G. (2000) Survival of tropical ballast water organisms during a cruise from Indian Ocean to the North Sea. *J. Plankton Res.* 22: 923-937.
11. Rigby, G. (2001) Ocean Exchange as a means of mitigating the risk of translocating ballast water organisms – A review of progress ten years down the line. *J. Mar. Environ. Eng.* 6: 153-173.
12. Dickman, M. & Zhang, F. (1999) Mid-ocean exchange of container vessel ballast water. 2. Effects of vessel type in the transport of diatoms and dinoflagellates from Manzanillo, Mexico to Hong Kong, China. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 17: 253-262.
13. Drake, L. A.; Ruiz, G. M.; Galil, B. S.; Mullady, T. L.; Friedman, D. O. & Dobs, F. C. (2002) Microbial ecology of ballast water during a transoceanic voyage and the effects of open-ocean exchange. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 233: 13-20.
14. Fahnenstiel, G.; Hong, Y.; Millie, D.; Doblin, M.; Johengen, T. & Reid, D. (2009) Marine dinoflagellate cyst in the ballast tank sediments of ships entering the Laurentian Great Lakes. *Verh Internat. Verein Limnol.* 30: 1035-1038.
15. Sutherland, T. F.; Levings, C. D.; Elliott, C. C. & Hesse, W. W. (2001) Effect of ballast water treatment system on survivorship of natural populations of marine plankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 210: 139-148.

16. Gregg, M. D. & Hallegraef, G. M. (2007) Efficacy of three commercially available ballast water biocides against vegetative microalgae dinoflagellates cyst and bacteria. *Harmful Algae*. 6: 567-584.
17. Lewis, V. (1989) Principles of Naval Architecture (2nd Rev.) Vol. 1. *Society of Naval Architects and Marine Engineers*. ISBN 09-397-7300-7.
18. Bennett, R. F. (1996) Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. In: Mora, S. J. Editor. Tributyltin: Case study of an environmental contaminant. *Cambridge University Press*. Cambridge, pp. 21-61.
19. Champ, M. A. (2000) A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related cost and benefits. *Sci. Total Environ*. 258: 21-71.
20. Omae, I. (2003) Organotin antifouling paints and their alternatives. *Appl. Organomet. Chem*. 17: 81-105.
21. Crow, J. F. & Kimura, M. (1970) An Introduction to Population Genetics Theory. In *Harper and Row* (ed) New York, NY, USA.
22. Schreiber, U.; Schliwa, U. & Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res*. 10: 51-62.
23. Luria, S. E. & Delbrück, M. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*. 28: 491-511.
24. Kimura, M. & Maruyama, T. (1966) The mutational load with epistatic gene interactions in fitness. *Genetics*. 54: 1337-1351.
25. Graham, L. E. & Willcox, L. E. (2000) *Algae*. Prentice Hall. New Jersey. 640 pp.
26. Costas, E. (1990) Genetic variability in growth rates in marine Dinoflagellates. *Genetica*. 83: 99-102.
27. Margalef, R. (1956) Estructura y dinámica de la «purga de mar» en la Ría de Vigo. *Inv. Pesq*. 5: 113-134.
28. Margalef, R.; Durán, M. & Sáiz, F. (1955) El fitoplancton de la ría de Vigo de enero a marzo de 1954. *Inv. Pesq*. 2: 85-129.
29. Durán, M.; Sáiz, F.; López-Benito, M. & Margalef, R. (1956) El fitoplancton de la Ría de Vigo de abril de 1954 a junio de 1955. *Inv. Pesq*. 4: 67-95.
30. Gould S. J. (2002) *The structure of evolutionary theory*. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts. 1433 pp.
31. Sniegowski, P. D. (2005) Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. *New Phytologist*. 166: 360-362.
32. López-Rodas, V.; Agrelo, M.; Carrillo, E.; Ferrero, L.; Larrauri, A.; Martín-Otero, L. & Costas, E. (2001) Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur. J. Phycol*. 36: 179-190.
33. Sánchez-Fortún, S.; Marvá, F.; Rouco, M.; Costas, E. & López-Rodas, V. (2009) Toxic effect and adaptation in *Scenedesmus intermedius* to anthropogenic chloramphenicol contamination: genetic vs. physiological mechanisms to rapid acquisition of xenobiotic resistance. *Ecotoxicol*. 18: 481-487.
34. Costas, E.; Carrillo, E.; Ferrero, L. M.; Agrelo, M.; García-Villada, L.; Juste, J. & López-Rodas, V. (2001) Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyos-*

- phaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea herbicide. *Phycologia*. 40: 391-398.
35. López-Rodas, V.; Flores-Moya, A.; Maneiro, E.; Perdigones, N.; Marva, F.; García, M. E. & Costas, E. (2007) Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of preselective mutations. *Evol. Ecol.* 21: 535-547.
 36. Marvá, F.; López-Rodas, V.; Rouco, M.; Navarro, M.; Toro, F. J.; Costas, E. & Flores-Moya, A. (2010) Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquatic Toxicol.* 26: 130-134.
 37. García-Villada, L.; López-Rodas, V.; Bañares, E.; Flores-Moya, A. & Costas, E. (2002) Evolution of microalgae in highly stressing environments: an experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by rare preselective mutation. *J. Phycol.* 38: 1074-1081.
 38. López-Rodas, V.; Carrera-Martínez, D.; Salgado, E.; Mateos-Sanz, A.; Báez, J. C. & Costas, E. (2009) A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in Arroyo Minero, Rio Negro, Argentina. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 75: 883-899.
 39. Carrera-Martínez, D.; Mateos-Sanz, A.; López-Rodas, V. & Costas, E. (2010) Microalgae response to petroleum spill: An experimental model analysing physiological and genetic response of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige. *Aquatic Toxicol.* 97: 151-159.
 40. Baos, R.; García-Villada, L.; Agrelo, M.; López Rodas, V.; Hiraldo, F. & Costas, E. (2002) Short-Term adaptation of microalgae in highly stressfull environments: an experimental model analising the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *Eur. J. Phycol.* 37: 593-600.
 41. García-Villada, L.; Rico, M.; Altamirano, M.; Sánchez, L.; López-Rodas, V. & Costas E. (2004) Ocuurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulphate as algacide. *Water Res.* 38: 2207-2213.
 42. Sánchez-Fortún, S.; López-Rodas, V.; Navarro, M.; Marvá, F.; D'Ors, A.; Rouco, M.; Haigh-Florez, D. & Costas, E. (2009) Toxicity and adaptation of *Dyctiosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1901-1905.
 43. López-Rodas, V.; Marvá, F.; Costas, E. & Flores-Moya, A. (2008) Microalgal adaptation in the stressful acidic, metal-rich mine waters from Mynydd Parys (N Wales, UK) could be due to selection of preselective mutants. *Environ. Exp. Bot.* 61: 43-48.
 44. Altamirano, M.; García-Villada, L.; Agrelo, M.; Sánchez, L.; Martín-Otero, L.; Flores-Moya, A.; López Rodas, V. & Costas, E. (2004) A novel approach to improve specificity of algal biosensor using wild-type and resistant mutants: an application to detect TNT. *Biosensors and Bioelectronics.* 19: 1319-1323.

45. Peña, E.; Maneiro, E.; Pérez, C.; Moreno, M. C. & Costas, E. (2009) Microalgae fiber optic biosensor for herbicide monitoring using sol gel technology. *Biosensor and Bioelectronics*. 24: 3538-3543.
46. López-Rodas, V.; Perdigones, N.; Marvá, F.; Maneiro, E.; Rouco, M.; Delgado, A.; Flores-Moya, A. & Costas, E. (2009) Living in Vulcan's forge: Algal adaptation to stressfull geothermal ponds on Vulcano Island (southern Italy) as result of pre-selective mutation. *Phycol. Res.* 57: 111-117.
47. Costas, E.; Flores-Moya, A. & López-Rodas, V. (2008) Rapid adaptation of algae to extreme environments (geothermal waters) by single mutation allows «Noah's Arks» for photosynthesizers during the Neoproterozoic «snowball Earth»? *New Phytol.* 189: 922-932.
48. López-Rodas, V.; Marvá, F.; Rouco, M.; Costas, E. & Flores-Moya, A. (2008) Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to the stressful acidic, mine metal-rich waters from Aguas Agrias Stream (SW Spain) as result of pre-selective mutations. *Chemosphere*. 72: 703-707.
49. Costas, E.; Flores-Moya, A.; Perdigones, N.; Maneiro, E.; Blanco, J. L.; García, M. E. & López-Rodas, V. (2007) How eukaryotic algae can adapt to the Spain's Rio Tinto: A neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *New Phytol.* 175: 334-339.
50. Flores-Moya, A.; Costas, E.; Bañares-España, E.; García-Villada, L.; Altamirano, M. & López-Rodas, V. (2005) Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through pre-selective mutations. *New Phytol.* 166: 655-661.
51. López-Rodas, V.; Maneiro, E.; Martínez, J.; Navarro, M. & Costas, E. (2006) Harmful algal blooms, red tides and human health: Diarrhetic sellfish poisoning and colorectal cancer. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 72: 391-408.
52. Maneiro, E.; López-Rodas, V.; Costas, E. & Martínez, J. (2008) Shellfish consumption: a major risk factor for colorectal cancer. *Medical Hypotheses*. 70: 409-412.
53. Martínez-Hernández, J.; López-Rodas, V. & Costas, E. (2009) Emerging Health Risk Due to Shellfish Consumption (Charpeher IX, pp. 157-166). In: *Fish Consumption and Health*. Gagne, G. P. & Mediano, R. H. Editors. Nova Science Publisher, Inc New York. 209 ISBN: 978-1-60741-151-2.

*** Información de contacto:**

Dr. Eduardo Costas.

Departamento de Genética (Producción Animal).

Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040. Madrid. Spain.

E-mail: ecostas@vet.ucm.es

- **Mutation of microalgae from antifouling sensitivity to antifouling resistance allows phytoplankton dispersion through ships' biofouling**

Biological Invasions, 15 (2013) 1739-1750

doi: 10.1007/s10530-012-0405-8

Mutation of microalgae from antifouling sensitivity to antifouling resistance allows phytoplankton dispersal through ships' biofouling

Eduardo Costas · Raquel Gonzalez ·
Victoria López-Rodas · I. Emma Huertas

Received: 30 November 2011 / Accepted: 31 December 2012 / Published online: 11 January 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Marine ecosystems are affected by introduced species including microalgae. We propose that biofouling on ships' hulls is a potentially important mechanism for microalgae dispersal worldwide. Biofouling samples, for phytoplankton composition analysis, were collected in Spanish Mediterranean ports from the hulls of ships that had completed oceanic journeys from other Mediterranean ports, and long journeys from the Atlantic and Indian Oceans. Samples representing the local population of phytoplankton either in the water column or attached to the biofouling of locally-based ship-hulls were used as controls. A broad variety of microalgae species (including toxic dinoflagellates), which were not present in the local phytoplankton populations were found on the biofouling film of the ships that had been on distant journeys. In spite of the presence of the antifouling paints containing toxic compounds, microalgae were able to rapidly adapt to these non-favourable conditions. Consequently, our study shows

that ships' biofouling seems to be a powerful vector for microalgae dispersal at a global scale due to the capacity of microalgae to attach to the biofouling film and to cope by adaptation mechanisms with antifouling compounds.

Keywords Biofouling · Mutation · Resistance · Dispersal · Introduced species · Microalgae

Introduction

Invasion of some harmful algal species severely threatens coastal ecosystems due to the ecological consequences on the marine trophic web but it also has devastating effects on human activities, such as aquaculture, fisheries and public health (Subba Rao et al. 1994; Hallegraeff 1998; Choi 2009).

One of the main mechanisms responsible for the dispersal of marine organisms to other habitats is the release of ballast water from large vessels (Hallegraeff and Bolch 1991; Gollasch et al. 2000; Rigby 2001; Dickman and Zhang 1999; Drake et al. 2002; Fahnenstiel et al. 2009). In addition, ships' hulls are colonized by many marine species, including bacteria, microalgae, macroalgae, and invertebrates, forming an often dense biofouling layer (Davidson et al. 2009; Sylvester and MacIsaac 2010). We hypothesised that biofouling may be a potent mechanism for the introduction of microalgae worldwide.

Anti-fouling paint is widely used to control the accumulation of biofouling on ships (Yebra et al. 2004). Since the 1960s, tributyltin (TBT) has been the

Eduardo Costas, Raquel Gonzalez, Victoria López-Rodas and I. Emma Huertas contributed equally to the study.

E. Costas · R. Gonzalez · V. López-Rodas (✉)
Genetica, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain
e-mail: vlrodas@vet.ucm.es

I. E. Huertas
Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC),
Polígono Río San Pedro s/n, 11519 Puerto Real,
Cádiz, Spain

main biocide component of anti-fouling paints, and it has been estimated that TBT was used on more than 70 % of the world's ocean going fleet in the year 2000 (Evans et al. 2000). Because TBT has been demonstrated to cause impairments in growth, development, reproduction and survival of many marine species (Heard et al. 1986), the International Convention of the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships (IMO 2008), proposed the prohibition of TBT and suggested the use of alternative antifouling coatings (Yebra et al. 2004), even though many TBT substitutes are also known to be noxious (Karlsson and Eklund 2004). In addition, despite the global prohibition of TBT substances, TBT is still present in many ports since most ships are painted in African and Asian ports where there are not strict controls (personal communication of ship captains and ship owners).

TBT is extremely poisonous for microalgae, even at nanomolar concentrations (Sidharthan et al. 2002). Nevertheless, it is known that microalgae are able to rapidly adapt to a wide variety of substances, including chemicals and pollutants. Microalgae can grow in the presence of toxic compounds as a result of physiological adaptation (i.e. acclimatization) that is supported by modifications of gene expression (Bradshaw and Hardwick 1989; Fogg 2001). Additionally, when the concentration of the toxic element exceeds the levels of physiological adaptation, survival depends exclusively on adaptive evolution driven by mutations that confer resistance (Sniegowski and Lenski 1995; Belfiore and Anderson 2001). As previously reported, this type of adaptation allows, for instance, for microalgae to thrive at high doses of heavy metals or in extremely hostile environments of mining effluents (Costas et al. 2007; López-Rodas et al. 2009).

In this study, we analyse the capacity of microalgae to resist the toxic effects of anti-fouling coatings, identifying the mechanisms involved (physiological acclimation vs. genetic adaptation). If phytoplankton can cope with the presence of the biocides contained in the anti-fouling paints, biofouling will be then a considerable mechanism for microalgae dispersal.

Materials and methods

Sampling biofouling

Microbiology swabs were rubbed from the antifouling paint of ships arriving to Mediterranean ports in

Comunidad Valenciana, on the east coast of Spain (Sagunto, Burriana, Castellon and Gandía) after long and distant oceanic journeys (more than 2,000 nautical miles in ships from the Indian and the Atlantic oceans) during 2010 summer after at least 2 months in the sea. The number of ships sampled was 27 (25 cargos and 2 tankers). Sampling was performed immediately after the ships were berthed at the quay to avoid biofouling colonization by local phytoplankton. Because the state of the antifouling paint may markedly vary with time, only ships that presented the antifouling coat in good condition (without any detectable macroscopic encrustations, such a barnacles, mussels, macroalgae etc) were sampled. Using these criteria, it was assumed the antifoulants were still present in the coating system and to be sure the coating paint was made of TBT the captain of every ship sampled was asked for. The swabs were immersed in culture flasks (Greiner, Bio-One Inc., Longwood NJ, USA) containing 20 ml of f/2 medium (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), which were stored at 15 °C in darkness until microalgae identification in the laboratory. This period never exceeded 24 h after sample collection.

Controls

Simultaneously, controls samples were isolated from the local population of phytoplankton either from the water column or attached to the biofouling on locally based ship hulls. Microalgae from biofouling of two locally based tugs at each port were sampled as described above simultaneously to ships arriving after oceanic journeys. From the water column, 250 ml water samples were collected along with samples with a phytoplankton net (5 µm). All samples were stored at 15 °C in darkness until microalgae identification in the laboratory (in less than 24 h after collection). Phytoplankton was microscopically identified in fresh samples and counted on fixed samples (4 % formalin) on settling chambers using an inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Germany) with the magnification of 200× and 400× to distinguish between classes and 600× to identify species.

Experimental organisms and growth conditions

Laboratory experiments were performed using three different species from the Algal Culture Collection of the Universidad Complutense (Madrid). *Navicula*

ramossissima (Grunow) Cleve (Bacillariophyta) and *Prochloron* sp. (Prochlorophyta) were isolated from the Gulf of Cadiz (SW Spain) whereas *Tetraselmis suecica* (Kytlin) Butcher (Prasinophyta) was collected in the Gulf of Lyon (NE Spain). All cultures were grown axenically in ventilated cell culture flasks covered with a filter cap (Greiner, Bio-One Inc., Longwood, NJ, USA) and containing 20 ml of f/2 Sigma algal culture medium (Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) and kept at 20 °C and under continuous illumination of 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm. The cultures were maintained in mid-log exponential growth by serial transfers of a cell inoculum to fresh medium (once per month). Prior to the experiments, the cultures were re-cloned by isolating a single cell in order to avoid the inclusion of any previous spontaneous mutant that could have appeared in the cultures.

Toxicity test: effect of TBT on microalgal growth

A stock solution of TBT (Sigma) was prepared in f/2 fresh medium and subsequently diluted to obtain concentrations of 0, 1, 3, 10, and 30 ppm respectively. Each culture was inoculated with 6×10^6 cells from mid-log exponentially growing cultures. Cultures were prepared in triplicate for each TBT dose and for unexposed controls. The toxic effect of TBT was estimated by calculating linear regression cell number versus TBT doses. In addition, the growth rate (m) in mid-log exponentially growing cells was derived from the equation (Crow and Kimura 1970):

$$N_t = N_0 e^{mt}$$

where $t = 7$ days (exposure time to a TBT dose) and N_t and N_0 represent the cell density at the end and at the beginning of the experiment, respectively. Both controls and TBT treated cultures were blinded counted using an Uriglass settling chamber (Biosiga, Cona, Italy).

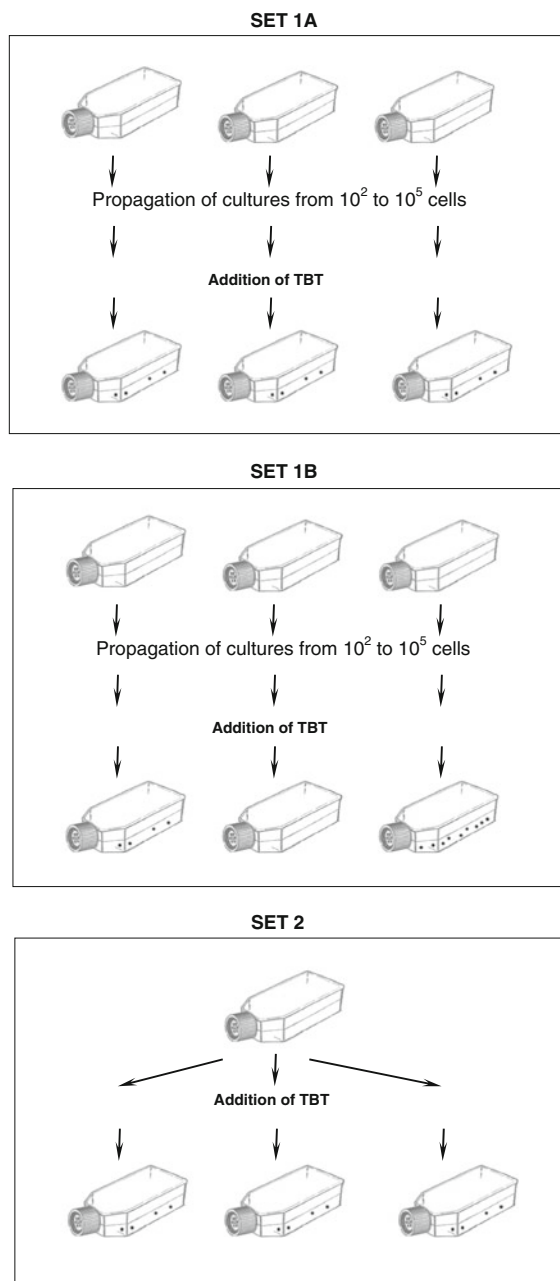
Microalgae adaptation to TBT

The key to understanding adaptation of microalgae seems to be characterizing the algal variants that appear after the massive destruction of sensitive cells. Microorganisms may adapt to TBT by two procedures through selection of spontaneous mutations that occur

prior to TBT exposure or through direct adaptation induced by TBT (i.e. physiological acclimation). In order to differentiate between these two phenomena, a modified fluctuation analysis (López-Rodas et al. 2001; Costas et al. 2001) was performed using TBT as the selective agent (Fig. 1). The modification of the analysis implies the use of liquid medium containing the selective agent rather than plating the cells on a solid medium, as the original design by Luria and Delbrück (1943) performed with bacterial cultures. Two different sets of experimental cultures were prepared for each species. In the set 1 experiment, 45 culture flasks were inoculated with $N_0 = 10^2$ cells (a number small enough to reasonably ensure the absence of pre-existing mutants in the inoculum). Cultures were grown in f/2 medium until $N_t = 1 \times 10^5$ cells and then exposed to 10 ppm TBT. In set 2 (controls) 20 aliquots of 1×10^5 cells from the same parental population growing in f/2 medium were separately transferred to culture flasks containing 10 ppm TBT. Cultures were kept for 75 days in order to ensure that if a mutant occurred, its progeny would be large enough to be detected and resistant cells would be subsequently counted. The cell count was performed by at least two independent observers.

According to Luria and Delbrück (1943) two different results can be attained in the set 1 experiment, each of them being interpreted as the independent consequence of two distinct adaptation mechanisms: (1) If the occurrence of resistant cells is induced by the presence of TBT, every cell is then likely to have the same possibility of developing resistance. Consequently, inter-culture (flask-to-flask) variation will be very low following the Poisson model (variance/mean = 1) (Fig. 1, set 1A); (2) On the contrary, if resistant cells arise by random mutations that occur spontaneously before exposure to TBT during the period in which the cultures reached N_t from N_0 , then the inter-culture (flask-to-flask) variation would be high, not consistent with the Poisson model (variance/mean > 1) (Fig. 1, set 1B). The set 2 cultures serve as control for the experimental error (Fig. 1) and hence variance is expected to be low because set 2 tracks the variance due to the parental population.

In addition, mutation rates can be estimated from the results of the fluctuation analysis. The proportion of set 1 cultures showing non-resistant cells after TBT exposure (P_0 estimator) is used to calculate the mutation rate (μ) as follows:



◀ **Fig. 1** Diagram of the fluctuation analysis. (In the SET 1 experiment, different cultures, each started from $N_0 = 10^2$ cells, were propagated under non-selective conditions until $N_t = 10^5$ cells), and finally supplemented with a lethal dose of TBT. The possible results are: SET 1A: physiological acclimation after addition of TBT. In this case, the number of resistant cells in all the cultures must be similar. SET 1B: adaptation by mutations occurring prior exposure of TBT. One mutational event occurred late in the propagation of culture 1 (therefore the density of TBT-resistant cells found is low) and early in the propagation of culture 3 (thus, density of TBT-resistant cells found is higher than in culture 1); no mutational events occurred in culture 2. The variance/mean ratio of the number of resistant cells per replicate must be >1 . SET 2 is the experimental control

TBT-resistant allele is detrimental to fitness in the absence of TBT, new mutants will arise in each generation but most of them will be eliminated sooner or later by natural selection, if not by chance (Crow and Kimura 1970). Eventually, there will be a certain number of resistant mutants that will not be eliminated. The balance between μ and the rate of selective elimination (s) will determine the average number of such mutants (Kimura and Maruyama 1966):

$$q = \mu / (\mu + s)$$

where q is the frequency of the TBT-resistant alleles and s is the selection coefficient against TBT-resistant alleles.

A classic Newcombe analysis (Newcombe 1949) was also applied to confirm the data obtained from the fluctuation analysis (Fig. 2). For each species, 20 agar plates were prepared (2 % agar in f/2 medium) and inoculated with 5×10^4 cells from the same parental population and allowed to grow for 20 days in the absence of TBT. In 10 of the plates, microalgae colonies were redistributed over the plate by spreading with a scraper whereas in the other 10 plates colonies remained un-spread. All plates were sprayed with a final dose of 10 ppm TBT in f/2 medium and allowed to grow for 15 days. In this case, two different results can be also obtained depending on the adaptation mechanism displayed by cells: (1) If resistant cells appear by rare spontaneous mutations that occur during growth before TBT exposure, each TBT-resistant mutant cell will originate one single colony on the undisturbed plates. In contrast, each TBT-resistant mutant cell will give rise to colonies formed by many resistant cells if they were originally dispersed by the re-spreading and thereby numerous resistant colonies will be generated. Consequently, the

$$P_0 = e^{-\mu(N_t - N_0)}$$

where P_0 is the proportion of cultures with no resistant cells, N_0 and N_t represent the initial and the final cell densities respectively and μ stands for the mutation rate, which is expressed therefore in mutants per cell division (Luria and Delbrück 1943).

If the mutation from a wild-type TBT-sensitive allele to a TBT-resistant allele is recurrent and the

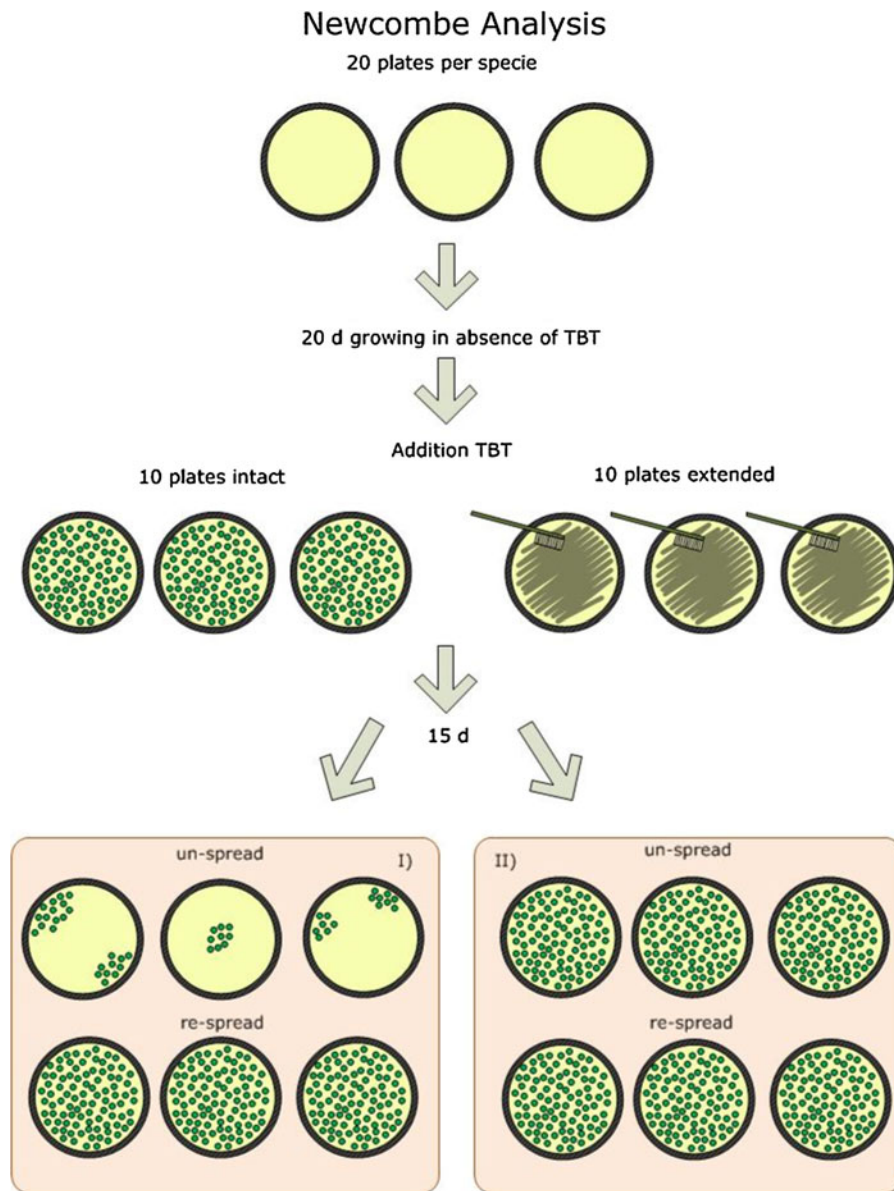


Fig. 2 Schematic diagram of the Newcombe analysis. Agar plates were prepared (2 % agar media in f/2 medium) and inoculated with 5×10^4 cells. They were allowed to grow in the absence of TBT. In 10 plates the microalgae colonies were redistributed. The other 10 plates remained un-spreading. All the plates were sprayed with a final dose of 10 TBT in f/2 medium. Two different results can be observed: (1) If resistant cells arose by rare spontaneous mutations that occur during the growth prior to TBT exposure, on the undisturbed plates, each TBT-resistant mutant cell would originate as only one colony. In contrast, each

TBT-resistant mutant cell originates a colony with many resistant cells, which are dispersed by the re-spreading generating numerous resistant colonies. Consequently, then colony number of the re-spread plates would be higher than those of un-spread plates; (2) If TBT induced the appearance of resistant cells, then all cells originated after the initial growth period would have the same probability to become resistant. Re-spreading would have redistributed the members of a homogeneous population and consequently, the number of resistant colonies would have been the same on the spread and un-spread plates

colony number on the re-spread plates must be higher than that on the un-spread plates (Fig. 2); (2) On the other hand, if resistance to TBT is achieved by

physiological acclimation, cells originated after the initial growth period will have the same probability to become resistant. Re-spreading will redistribute the

members of a homogeneous population and consequently, the number of resistant colonies will be the same on the spread and on the un-spread plates (Fig. 2).

Growth of TBT-sensitive and TBT-resistant cells on antifouling paint

The bottom of 24 plates (Nunclon Delta Surface, Denmark) were painted with TBT-antifouling paint (Hempel, Polinya, Barcelona, Spain) and after a period of 24 h, 10 ml of fresh f/2 medium were added to each plate, then 6 of such plates were inoculated with 5×10^5 wild type TBT-sensitive cells of *N. ramossisima*. Additionally, 6 bottom painted plates with an inoculum of 5×10^5 TBT-resistant mutants cells, which were obtained from the fluctuation analysis, were also prepared. An identical procedure was followed for *T. suecica*. The plates were maintained at 20 °C under continuous light of $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm and preserved 15 days for cell growth.

Results

Microalgal species potentially transferred from a remote location

Twenty species of microalgae species (Table 1) were detected exclusively on biofouling of ships arriving in the Mediterranean ports after long and distant oceanic journeys; these species were not present in local phytoplankton samples or on local vessel hulls. A wide variety of potentially introduced microalgae classes (Cyanobacteria, Bacillariophyta, Dinoflagellata, Haptophycophyta, and Chlorophycophyta) were identified. Chlorophycophyta (*Tetraselmis* sp.) and Bacillariophyta (*Nitzschia closterium*) were recurrently detected in the biofouling that covered the underwater hull of ships arriving from the Indian Ocean, the Atlantic and the Mediterranean. The toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* only was detected on ships arriving to ports of Comunidad Valenciana from the Atlantic and Indian Ocean.

Toxic effect of TBT on microalgae

As expected, TBT was extremely toxic for the assayed organisms and growth was irreversibly inhibited by

1 ppm of TBT. Dose-effect of TBT (cell number vs. doses) shows a statistically significant linear regression ($p < 0.01$ R^2 of 0.98; 0.90 and 0.79 for *T. suecica*, *N. ramossisima* and *Prochloron* sp. respectively).

Adaptation of microalgae to antifouling products

Fluctuation analysis resulted in two different cell responses (Table 2). In the case of *N. ramossisima* and *T. suecica* a massive destruction of cells was observed immediately after TBT addition. Nevertheless, after further incubation for 75 days, cell density was observed to increase in some cultures, which indicates the appearance of at least one TBT-resistant variant. In the case of set 1, only some cultures showed appreciable cell growth (Table 2) whereas all set 2 cultures recovered. A high fluctuation was detected in the set 1 experiment (i.e. from 0 to more than 12×10^6 *N. ramossisima* resistant cells per culture flask; from 0 to more than 8×10^3 *T. suecica* resistant cells) (Table 2). On the contrary, set 2 culture flasks (controls) of both species displayed a scarce variation, which can be attributed to the experimental error (Table 2). Consequently, in set 1 cultures of both species, the variance significantly exceeded the mean (variance/mean ratio > 1 ; $p < 0.001$ using χ^2 as a test of goodness of fit). As the large fluctuation found in set 1 cultures is related to processes different than the sampling error, it could be inferred that TBT-resistant cells arose by rare, pre-selective spontaneous mutations rather than by specific physiological adaptation appearing in response to TBT.

Mutation rates (μ) from TBT-sensitivity to TBT-resistance were 4.77×10^{-6} and 8.54×10^{-7} mutants per cell division in *N. ramossisima* and *T. suecica*, respectively.

The Newcombe analysis corroborated the cell response observed (Fig. 3a, b). The number of colonies was higher on the re-spread plates as compared to that on undisturbed ones (180.6 ± 21.3 vs. 88.1 ± 12.1 , mean number of colonies \pm sum of re-spread and undisturbed plates respectively), with the two means being significantly different ($U = 9$, $U' = 81$; $p < 0.01$, Mann–Whitney U test). This result demonstrated that resistant cells arose by spontaneous mutation during the growth period in the absence of TBT.

On the other hand, *Prochloron* sp. was unable to acclimate or adapt to TBT. All *Prochloron* cells died in each experimental culture after TBT addition.

Table 1 List of potentially non-indigenous microalgae species

	Port of origin located in		
	Mediterranean sea (16 ships)	Atlantic Ocean (9 ships)	Indic Ocean (2 ships)
	Cyanoprokaryota		
<i>Synechococcus bacillaris</i> Butcher	+	+	
<i>Synechocystis</i> sp.		+	
<i>Lyngbya littoralis</i> (Linnaeus) Dillwyn	+	+	
<i>Schizothrix litoralis</i> Hansgirg		+	
<i>Trichodesmium indicum</i> Reinsch	+	+	
<i>Calothrix</i> sp.	+		+
	Bacillariophyta		
<i>Nitzschia closterium</i> f. <i>minutissima</i> Allen and Nelson	+	+	+
<i>Hantzschia marina</i> (Donkin) Grunow		+	+
<i>Cymbella</i> sp.	+		
<i>Navicula ramosissima</i> (Agardh) Cleve	+		
<i>Rhizosolenia alata</i> Brightwel	+	+	
<i>Coscinodiscus alboranii</i> Pavillard	+		
<i>Asterionella japonica</i> Cleve	+		+
<i>Amphora crassa</i> Gregory			+
	Dinoflagellata		
<i>Prorocentrum lima</i> (Ehrenberg) Stein		+	+
<i>Protopteridinium oceanicum</i> (VanHöffen) Balech	+		+
	Haptophycophyta		
<i>Prymnesium zebrinum</i> Billard		+	
<i>Chrysochromulina</i> sp.		+	
	Chlorophycophyta		
<i>Tetraselmis marina</i> (Cienkowski) Norris, Hori and Chihara	+	+	+
<i>Dunaliella viridis</i> Teodoresco	+		

They were detected exclusively on biofouling of ships arriving to ports of Comunidad Valenciana (Sagunto, Burriana, Castellón, Gandía), (E of Spain) after large oceanic journeys, but not in the native population of phytoplankton (neither planktonically nor attached within biofouling populations on locally-based ship-hulls) are indicated by a “+”

Moreover, after further incubation for 75 days, neither cultures of set 1 nor those in set 2 could recover, indicating a total absence of TBT-resistant cells. In addition, no growth was observed in Newcombe experiments.

TBT-resistant mutants growing in the absence of the selective agent (i.e. in f/2 medium without TBT) showed fitness values lower than those found in the wild-type strains (Table 3). The relative values of fitness of resistant mutants and sensitive wild types were used to estimate the coefficient of selection (*s*) of TBT-resistant mutants in the absence of TBT (Table 3). A total of 2.07×10^{-5} and 2.66×10^{-6}

TBT-resistant mutants were present in populations of *N. ramosissima*, and *T. suecica* respectively in the absence of TBT (Table 3).

Discussion

Most work on ships' translocation of microalgae focuses on ballast water, and most work on ships' hull fouling focuses on macroalgae and marine invertebrates. Thus, studies on dispersal of microalgae in hull fouling are limited. A broad variety of microalgae species were found exclusively on biofouling of ships

Table 2 Fluctuation analysis from TBT-sensitivity to TBT-resistance

	Set 1	Set 2
<i>Navicula ramossissima</i>		
No. of replicate cultures	45	20
No. of cultures containing the following no. of TBT resistant cells		
0	20	0
1×10^6 to 4×10^6	5	0
4×10^6 to 8×10^6	2	0
8×10^6 to 12×10^6	1	20
$>12 \times 10^6$	13	0
Variance/mean ratio (of the number of resistant cells per replicate)	11.31 ^a	1.08
Fluctuation	Yes	No
Adaptation process	Genetic	
μ (mutants per cell per generation)	4.77×10^{-6}	
<i>Tetraselmis suecica</i>		
No. of replicate cultures	45	20
No. of cultures containing the following no. of TBT resistant cells		
0	38	0
1×10^3 to 3×10^3	1	0
3×10^3 to 5×10^3	1	0
5×10^3 to 8×10^3	2	20
$>8 \times 10^3$	3	0
Variance/mean ratio (of the number of resistant cells per replicate)	6.21 ^a	1.12
Fluctuation	Yes	No
Adaptation process	Genetic	
μ (mutants per cell per generation)	8.54×10^{-7}	
<i>Prochloron</i> sp.		
No. of replicate cultures	45	20
No. of cultures containing the following no. of TBT resistant cells		
0	45	20
Adaptation process	None	

^a Variance/mean >1 ; $p < 0.001$, using χ^2 as a test of goodness of fit

arriving to the Mediterranean ports after long and distant oceanic journeys. These microalgae could be potentially transferred from a remote location, suggesting that ship transport is a potential mechanism for microalgae dispersal.

Cyanobacteria and pennate diatoms, which can easily attach to surfaces by mucilage secretions (Graham and Willcox 2000) were very abundant

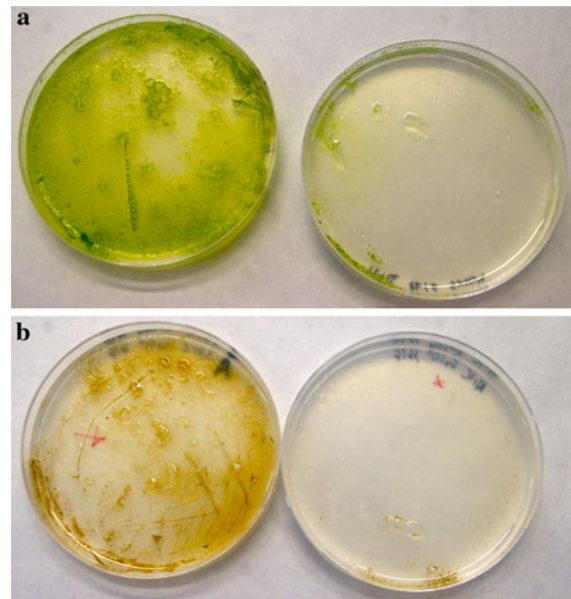


Fig. 3 Photographs of newcombe analysis in *T. suecica* (a) and *N. ramossissima* (b). On the right un-spread plates with a high number of mutant colonies. On the left un-spread plates where mutants formed a scarce number of colonies

along with benthic dinoflagellates. Planktonic species of chlorophycophyta and haptophyta were also components of the biofouling.

Long-distance transport of toxin-producing microalgae is particularly worrisome. *Prorocentrum lima* involved in DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning) syndromes was detected. During the 1950s Margalef analysed the microalgae species composition in the Ría de Vigo, NW Spain, (Margalef 1956; Margalef et al. 1955; Durán et al. 1956) providing an extensive list of phytoplankton species. However, the works by Margalef never reported some of the species that constitute the main components of the harmful algal blooms (HABs) in the Ría de Vigo nowadays. Could these microalgae have arrived to the Ría of Vigo as consequence of shipping transport? Since NW Spain is among the most important areas for shellfish aquaculture (i.e. mussels, cockles, oysters, clams and scallops) in Europe, the economic impact of introduced HABs species could be enormous. In this sense, molecular probes have suggested a human introduced toxic strain of *Alexandrium catenella* from Pacific to Thau lagoon (France), perhaps via the ballast water of a ship docked at Sète (France) a shipping port in direct communication with the lagoon (Lilly et al. 2002).

Table 3 Growth rate (m), coefficient of selection against resistant mutant (s) and frequency of the TBT-resistance allele (q) in *Navicula ramossissima* (Bacillariophyta) and *Tetraselmis suecica*

(Prasinophyta), during genetic adaptation to TBT (see Table 2 for the fluctuation analysis)

	m_{TBT_r}	m_{TBT_s}	μ	S	q
<i>Navicula ramossissima</i>	0.15	0.65	4.77×10^{-6}	0.23	2.07×10^{-5}
<i>Tetraselmis suecica</i>	0.14	0.44	8.54×10^{-7}	0.32	2.66×10^{-6}

The key to understanding microalgae dispersal by ships is to identify the mechanisms that allow microalgae to survive attached to the submersed surface of the ships' hulls. Our study shows that growth was irreversibly inhibited by TBT concentrations much lower than those used in antifouling paints. The deadly effect of TBT on the 3 species assayed here indicates that antifouling paint can act as a powerful barrier against microalgae. Therefore, survival of microalgae attached to the antifouling coat must be achieved by some kind of adaptation. However, our results seem to indicate that adaptation takes place through a genetic process. When *N. ramossissima* and *T. suecica* were exposed to TBT, growth was completely inhibited after a few days owing to the massive die off of sensitive cells by the toxic effect of TBT. Nevertheless, after further incubation for 75 days, cell density rose in certain cultures, due to the growth of cells that were possibly resistant to TBT. The best approach to understand the adaptation of the two species to TBT is to analyse the rare variants that proliferate after the massive die off of the sensitive cells by TBT, and thereby detecting which mechanisms allow for these species to survive over time when attached to antifouling paint.

Fluctuation analysis is the most suitable method to discriminate between TBT resistant cells arising through specifically acquired adaptation in response to TBT selection (i.e. physiological acclimation or post-selective TBT-induced mutations), and TBT-resistant cells arising by rare spontaneous mutations occurring randomly during replication of organisms under non-selective conditions (i.e. prior to exposure to TBT) (reviewed on Sniegowski and Lenski 1995). The large fluctuation in the number of resistant cells detected in the set 1 experiment as compared to the scarce fluctuation in set 2 controls unequivocally demonstrates that these resistant cells arose by rare spontaneous single mutations (which mainly occur prior to TBT exposure) and not through direct and specific adaptation in response to TBT.

In addition, results of the fluctuation analysis suggest that only one gene is implicated in the TBT-resistance process. If several genes were involved in TBT resistance, then we would be unable to detect TBT-resistant cells growing in flasks of set 1 experiment since there would be a low probability for multiple mutations to occur at the same time. Consequently, microalgae could adapt to antifouling paints much more rapidly by single mutation than if survival required multiple mutations.

Results of the Newcombe analysis also corroborated that TBT resistance was achieved by rare spontaneous mutations. The number of TBT resistant colonies was always higher on the re-spread plates indicating that the resistant cells arose by rare spontaneous mutation during the growth phase prior to TBT addition.

Several lines of evidences suggest that single spontaneous mutations that occur in one locus are the pacemaker in rapid adaptation of microalgae to extremely toxic anthropogenic spills (Baos et al. 2002; López-Rodas et al. 2008a; Carrera-Martínez et al. 2010, 2011). Single spontaneous mutations also allow microalgae to survive in extreme environments such as sulphurous waters (Flores-Moya et al. 2005), acid rivers (López-Rodas et al. 2008b) or volcanic hot springs (Costas et al. 2008; López-Rodas et al. 2009). Even some Chlorophyta species are able to cope with the extremely hostile ecosystem conditions of Rio Tinto (which is used as a model for the astrobiology of Mars) at pH 2 and more than 20 g l^{-1} of heavy metals (Costas et al. 2007).

However, the fact that adaptation to TBT is not a straightforward process can be deduced from the different responses obtained here. Thus, *Prochloron* sp. was unable to grow in the presence of TBT under any of the assays performed. Also, *Prochlorophyta* species were not detected in the biofouling attached to the submersed part of the ships' hull even though organisms belonging to this algal class are very abundant in the marine phytoplankton community worldwide. Laboratory observations with *Prochloron* sp. have shown that

this species can effectively attach to culture flasks surfaces. Prochlorophyta species can be easily detected on underwater surfaces without any antifouling coats (i.e. underwater mooring ropes, piles). Our findings suggest that Prochlorophyta cannot adapt to TBT. Toxic compounds used in antifouling paints (i.e. TBT, Cu) could affect microalgal species differently. Recent work estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to pollution has shown that some taxonomic groups have a great capacity for adaptation (Huertas et al. 2010). On the other hand, the mutation rates from TBT-sensitivity to TBT-resistance (around 10^{-7} mutants per cell division) were slightly lower than the mutation rates previously described in microalgae to other substances, such as TNT-, chloramphenicol, chromium (VI), simazine, and diquat resistance (around 10^{-5} – 10^{-6} mutants per cell division; García-Villada et al. 2002; Sánchez-Fortún et al. 2009; Marvá et al. 2010). Only mutation rates from sensitivity to resistance against the modern herbicide glyphosate (3.6×10^{-7} mutants per cell division, López-Rodas et al. 2007) yield a comparable value. Special attention requires mutation rates from copper-sensitivity to copper-resistance (1.8×10^{-6} mutants per cell division, García-Villada et al. 2004), which suggests that new antifouling paints (based on copper instead of TBT) could be more inefficient to prevent microalgal biofouling than TBT-based ones. The mutation rate from TBT-sensitivity to TBT-resistance was estimated in 4.77×10^{-6} and 8.54×10^{-7} mutants per cell division in *N. ramossissima* and *T. suecica* respectively and the mutation rates from copper-sensitivity to copper-resistance is 1.8×10^{-6} mutants per cell division (García-Villada et al. 2004). Therefore, if new antifouling paints combined these two substances the probability of mutant resistant cells to occur would be significantly lower because of the additive effect of the two mutation rates and it would be almost impossible to find resistant mutants against two substances at the same time.

In spite of the low mutation rate from TBT-sensitivity to TBT-resistance obtained here, the presence of TBT-resistant cells is regulated by the recurrent appearance of mutants and their elimination by selection, yielding an equilibrium frequency of around 2 TBT-resistant cells per 10^5 TBT-sensitive cells in *N. ramossissima* and 2.6 per 10^6 in *T. suecica*. This fraction of resistant mutants is presumably high enough to assure a rapid colonization of ship hulls

given that the natural populations of microalgae are composed by a large number of cells.

Long-distance navigation is a characteristic of human civilizations. In spite of the use of toxic antifouling paints to avoid the biofouling formation in the underwater body of ships, numerous species of microalgae continue being dispersed worldwide due to mechanisms that confer resistance. Rare spontaneous mutations assuring resistance against TBT seem to be enough to allow survival of microalgae populations in antifouling paints. Although there remain many uncertainties concerning the impact of non-indigenous microalgal species in marine ecosystems, it is well known that introduced toxic microalgae species would be an important menace (Lilly et al. 2002). Accordingly, more studies are needed in order to further obtain a best picture of the effect of non-indigenous species on the functioning of the ecosystems and the evolution of the different phytoplankton populations.

Acknowledgments This work has been financially supported by the Spanish Ministry of Sciences and Innovation through the grants CTM 2008-05680 C02-02 and CGL 2008-00652/BOS. Authors thank the financial support given by the Spanish Ministry of Education and Science, through FPU program. Special Thanks are given Lara de Miguel Fernandez by technical support and J. A. Gonzalez Fuster by his enriching advices. Authors are also very grateful with to the assistance provided by the anonymous reviewers.

References

- Baos R, García-Villada L, Agrelo M, LopezRodas V, Hiraldo F, Costas E (2002) Short-term adaptation of microalgae in highly stressfull environments: an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. Eur J Phycol 37:593–600
- Belfiore NM, Anderson SL (2001) Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. Mutat Res 489:97–122
- Bradshaw AD, Hardwick K (1989) Evolution and stress-genotypic and phenotypic components. Biol J Linn Soc 37:137–155
- Carrera-Martínez D, Mateos-Sanz A, López-Rodas V, Costas E (2010) Microalgae response to petroleum spill: an experimental model analysing physiological and genetic response of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker prestige. Aquat Toxicol 97:151–159
- Carrera-Martínez D, Mateos-Sanz A, López-Rodas V, Costas E (2011) Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. Aquat Toxicol 101:342–350
- Choi KH (2009) Risk assessment of ballasted water-mediated invasion of phytoplankton: a modelling study. Ocean Sci J 44:221–226

- Costas E, Carrillo E, Ferrero LM, Agrelo M, García-Villada L, Juste J, López-Rodas V (2001) Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea herbicide. *Phycologia* 40:391–398
- Costas E, Flores-Moya A, Perdígones N, Maneiro E, Blanco JL, García ME, López-Rodas V (2007) How eukaryotic algae can adapt to the Spain's Rio Tinto: a neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *New Phytol* 175:334–339
- Costas E, Flores-Moya A, López-Rodas V (2008) Rapid adaptation of algae to extreme environments (geothermal waters) by single mutation allows “Noah's Arks” for photosynthesizers during the Neoproterozoic “snowball Earth”? *New Phytol* 189:922–932
- Crow JF, Kimura M (1970) An introduction to population genetics theory. Harper and Row, New York, p 591
- Davidson IC, Brown CW, Sytsmaa MD, Ruiz GM (2009) The role of containerships as transfer mechanisms of marine biofouling species. *Biofouling* 25:645–655
- Dickman M, Zhang F (1999) Mid-ocean exchange of container vessel ballast water. 2. Effects of vessel type in the transport of diatoms and dinoflagellates from Manzanillo, Mexico to Hong Kong, China. *Mar Eco Prog Ser* 17:253–262
- Drake LA, Ruiz GM, Galil BS, Mullady TL, Friedman DO, Dobs FC (2002) Microbial ecology of ballast water during a transoceanic voyage and the effects of open-ocean exchange. *Mar Ecol Prog Ser* 233:13–20
- Durán M, Saiz F, López-Benito M, Margalef R (1956) El fitoplancton de la Ría de Vigo de Abril de 1954 a Junio de 1955. *Inv Pesq* 4:67–95
- Evans SM, Birchenough AC, Brancato MS (2000) The TBT ban: out of the frying pan into the fire? *Mar Pollut Bull* 40:204–211
- Fahnenstiel G, Hong Y, Millie D, Doblin M, Johengen T, Reid D (2009) Marine dinoflagellate cyst in the ballast tank sediments of ships entering the Laurentian Great Lakes. *Verh Intern Ver Limnol* 30:1035–1038
- Flores-Moya A, Costas E, Bañares-España E, García-Villada L, Altamirano M, López-Rodas V (2005) Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through pre-selective mutations. *New Phytol* 166:655–661
- Fogg GE (2001) Algal adaptation to stress—some general remarks. In: Rai LC, Gaur JP (eds) *Algal adaptation to environmental stresses. Physiological, biochemical and molecular mechanisms*. Springer, Berlin, pp 1–20
- García-Villada L, López-Rodas V, Bañares E, Flores-Moya A, Costas E (2002) Evolution of microalgae in highly stressing environments: an experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by rare preselective mutation. *J Phycol* 38:1074–1081
- García-Villada L, Rico M, Altamirano M, Sanchez L, López-Rodas V, Costas E (2004) Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulphate as algacide. *Water Res* 38:2207–2213
- Gollasch S, Dammer M, Lenz J, Andres HG (2000) Survival of tropical ballast water organisms during a cruise from Indian Ocean to the North Sea. *J Plankton Res* 22:923–937
- Graham LE, Willcox LE (2000) *Algae*. Prentice Hall, New Jersey, p 640
- Hallegraeff GM (1998) Transport of toxic dinoflagellates via ships' ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Mar Ecol Prog Ser* 168:297–309
- Hallegraeff GM, Bolch CJ (1991) Transport of toxic dinoflagellate cysts via ships' ballast water. *Mar Pollut Bull* 22:27–30
- Heard CS, Walker WW, Hawkins WE (1986) Aquatic toxicological effects of organotins: an overview. *Oceans* 2:554–563
- Huertas E, Rouco M, López-Rodas V, Costas E (2010) Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytol* 188:478–487
- Karlsson J, Eklund B (2004) New biocide-free anti-fouling paints are toxic. *Mar Pollut Bull* 49:456–464
- Kimura M, Maruyama T (1966) The mutational load with epistatic gene interactions in fitness. *Genetics* 54:1337–1351
- Lilly EL, Kulis DM, Gentien P (2002) Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *J Plankton Res* 24:443–452
- López-Rodas V, Agrelo M, Carrillo E, Ferrero L, Larrauri A, Martín-Otero L, Costas E (2001) Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur J Phycol* 36:179–190
- López-Rodas V, Flores-Moya A, Maneiro E, Perdígones N, Marv F, García ME, Costas E (2007) Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of preselective mutations. *Evol Ecol* 21:535–547
- López-Rodas V, Marv F, Costas E, Flores-Moya A (2008a) Microalgal adaptation in the stressful acidic, metal-rich mine waters from Mynydd Parys (N Wales, UK) could be due to selection of preselective mutants. *Environ Exp Bot* 61:43–48
- López-Rodas V, Marv F, Rouco M, Costas E, Flores-Moya A (2008b) Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to the stressful acidic, mine metal-rich waters from Aguas Agrias Stream (SW Spain) as result of pre-selective mutations. *Chemosphere* 72:703–707
- López-Rodas V, Carrera-Martínez D, Salgado E, Mateos-Sanz A, Baez JC, Costas E (2009) A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in Arroyo Minero, Rio Negro, Argentina. *Anal Real Acad Nac Farm* 75:883–899
- Luria SE, Delbrück M (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28:491–511
- Margalef R (1956) Estructura y dinmica de la “purga de mar” en la Ra de Vigo. *Inv Pesq* 5:113–134
- Margalef R, Duran M, Saiz F (1955) El fitoplancton de la ra de Vigo de enero a marzo de 1954. *Inv Pesq* 2:85–129
- Marv F, López-Rodas V, Rouco M, Navarro M, Toro FJ, Costas E, Flores-Moya A (2010) Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquat Toxicol* 26:130–134

- Newcombe HB (1949) Origin of bacterial variants. *Nature* 164:150–151
- Rigby G (2001) Ocean exchange as a means of mitigating the risk of translocating ballast water organisms—a review of progress ten years down the line. *J Mar Environ Eng* 6: 153–173
- Sánchez-Fortún S, López-Rodas V, Navarro M, Marvá F, D'ors A, Rouco M, Haigh-Florez D, Costas E (2009) Toxicity and adaptation of *Dyctiosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environ Toxicol Chem* 28:1901–1905
- Sidharthan M, Young KS, Woul LH, Soon PK, Shin HW (2002) TBT toxicity on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Mar Pollut Bull* 45:177–180
- Sniegowski PD, Lenski RE (1995) Mutation and adaptation: the directed mutation controversy in evolutionary perspective. *Annu Rev Ecol Evol* S26:553–578
- Subba Rao DV, Sprules WG, Locke A, Carlton JT (1994) Exotic phytoplankton from ships' ballast water treatment system: risk of potential spread to mariculture sites on Canada's East Coast. *Can Data Rep Fish Aquat Sci* 937:51
- Sylvester F, MacIsaac HJ (2010) Is vessel hull fouling an invasion threat to the Great Lakes? *Divers Distrib* 16: 132–143
- Yebra DM, Kiil S, Dam-Johansen K (2004) Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coat* 50:75–104

- **Investigación complementaria: Adaptación de la microalga *D. chlorelloides* a la contaminación por metales pesados: plomo e iridio.**

Investigación complementaria

Adaptación de la microalga *D. chlorelloides* a la contaminación por metales pesados: plomo e iridio

La presencia de metales pesados en los ecosistemas acuáticos puede ser producida de forma natural, en este caso suele ser debida, fundamentalmente, a la meteorización más o menos lenta de los suelos con la consiguiente lixiviación de las rocas que los constituyen. Generalmente, estos procesos naturales no son muy intensos por lo que tampoco suelen causar efectos deletéreos graves sobre la salud de los organismos. Sin embargo, determinadas actividades humanas, como el desarrollo de la industria y la agricultura, promueven la incorporación al medio ambiente de sustancias ajenas a él, provocando un rápido aumento de la contaminación por una gran variedad de sustancias de carácter tóxico, ocupando un lugar preponderante entre ellas los metales pesados. Ejemplos claros son los procesos metalúrgicos que abarcan desde las labores mineras hasta sus técnicas de manufactura, pasando por los propios procesos extractivos; sin olvidar otras actividades que también suponen el manejo de disoluciones con elevados contenidos en metales como las de decapado y electrorrecubrimiento (Capó-Martí, 2007). En definitiva, la descarga al ambiente de residuos industriales de este tipo, entre otras causas, hace que muchos metales pesados estén presentes en los ambientes naturales y, muy frecuentemente, en concentraciones mucho más elevadas de lo deseable.

La contaminación por metales pesados podría representar un modelo adecuado para profundizar en la investigación de la adaptación del fitoplancton a las nuevas condiciones ambientales; dicho estudio podría realizarse con algunos de los metales especialmente tóxicos, como el plomo o el iridio. De este modo, podría evaluarse los efectos de la contaminación causados actualmente por la industria minera o, además, simular los que, en su momento, se produjeron en nuestro planeta por otro tipo de fenómenos, como la eyección de material magmático procedente, muy probablemente, del núcleo interno de la Tierra, como pueden ser las “plumas de manto”, o el impacto de algún gran cuerpo de origen meteórico que contuviera nuevas sustancias con alta toxicidad para la vida, como lo muestra el límite geológico K-T, que dio lugar a la hipótesis de Álvarez (Álvarez *et al.*, 1980), el cual habría sido la causa de la extinción

de los dinosaurios y de muchas otras especies hace 65 millones de años. Esta hipótesis ha sido confirmada, muy recientemente, por Renne y colaboradores con un trabajo realizado en la Universidad de California en Berkeley (Renne *et al.*, 2013). Precisamente, el límite geológico KT coincide con un contenido anómalamente alto de elementos del grupo del platino (PGE), tales como Re, Ir, Ru y Os, y situado entre 10 y 30 veces mayor que el promedio observado en las rocas de la corteza terrestre (Lee *et al.*, 2003).

De acuerdo con este planteamiento, el objetivo principal de esta parte del trabajo experimental llevado a cabo fue investigar los diferentes mecanismos que pudieran haber conferido a las microalgas mesófilas la capacidad de adaptación a una contaminación inesperadamente alta de metales pesados. Se seleccionó a *D. Chlorrelloides* como un ejemplo representativo de este grupo de microorganismos fitoplanctónicos. Para realizar este estudio se han utilizado dos metales: el Ir, por participar en el pasado en el proceso de extinción del fitoplancton y el Pb por ser un contaminante con relativa frecuencia en el presente.

RESULTADOS

Efecto de los metales sobre la tasa de crecimiento

Inicialmente, antes de realizar el análisis de fluctuación, se midió la concentración de cada metal que causaba el 100 % de inhibición del crecimiento en células de genotipo salvaje. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.I.

Tabla 6.I. Concentraciones de los metales utilizados en el análisis de fluctuación que causaron el 100 % de inhibición del crecimiento.

	Ir	Pb
Concentración (mg/L)	7	45

Análisis de fluctuación

Los análisis de fluctuación realizados proporcionaron los resultados presentados en la tabla 6.II. En el caso de ambos metales se observó una inicial muerte masiva de las células, manifestada de forma inmediata tras la adición de cada metal. Sin embargo, después de una incubación adicional de 75 días, la densidad celular aumentó en algunos cultivos, lo que indicó la aparición de, al menos, una variante resistente. En el caso del set 1, sólo algunos replicados mostraron un crecimiento celular apreciable, mientras que todos los replicados que componían el set 2 recuperaron la densidad celular. Por lo que se detectó una fluctuación alta en el conjunto de replicados del set 1 (es decir, había un amplio margen de variabilidad: desde cultivos sin células resistentes hasta cultivos que contenían más de $6 \cdot 10^6$ células de *D. chlorelloides* resistentes al iridio y más de $15 \cdot 10^6$ células resistentes en el caso del plomo. Por el contrario, el conjunto de cultivos control del Set 2 en ambos metales mostró una escasa variación en la concentración celular, lo que, principalmente, puede atribuirse al error experimental.

En consecuencia, en el conjunto de cultivos del set 1 de cada metal, el coeficiente de variación (varianza / media) dio como resultado un número muy superior a la unidad, ya que la varianza superaba significativamente la media ($P < 0,001$ mediante χ^2 como una prueba de bondad de ajuste). Por lo que la elevada fluctuación se relaciona con procesos diferentes al error de muestreo y se podría inferir que surgieron células resistentes al metal por raras mutaciones espontáneas pre-selectivas en lugar de por una adaptación fisiológica específica que pudiera haber aparecido en respuesta a la contaminación. Siendo, las tasas de mutación (μ) de sensibilidad a resistencia de $2,28 \times 10^{-5}$ y $9,9 \times 10^{-7}$ mutantes por división celular en Ir y Pb, respectivamente.

Tabla 6.II. Análisis de fluctuación frente a iridio(a) y plomo (b).

a)

<i>Especie: D. chlorelloides</i>			
Metales		Ir 10 mg/L	
		Set 1	Set 2
Número de replicados por Set		48	24
Número de cultivos que contienen células resistentes	0 cels.	5	0
	$<10^6$ cels.	2	0
	$2 \cdot 10^6 - 4 \cdot 10^6$ cels.	12	24
	$4 \cdot 10^6 - 6 \cdot 10^6$ cels.	13	0
	$> 6 \cdot 10^6$ cels.	16	0
Fluctuación		Sí	
Tipo de adaptación		Genético	

b)

<i>Especie: D. chlorelloides</i>			
Metales		Pb 60 mg/L	
		Set1	Set2
Número de replicados por Set		96	48
Número de cultivos que contienen células resistentes	0 cels.	87	0
	$<10^6$ cels.	1	0
	$10^6 - 1 \cdot$ cels.	3	48
	$10 \cdot 10^6 - 15 \cdot 10^6$ cels.	2	0
	$> 15 \cdot 10^6$ cels.	3	0
Fluctuación		Sí	
Tipo de adaptación		Genético	

CAPÍTULO III

¿Cuáles son los límites de la adaptación?

Una vez comprobada la capacidad de adaptación de los microorganismos fitoplanctónicos a la presencia de determinados agentes selectivos, el interrogante que se plantea a continuación es: ¿es posible que su capacidad de adaptación continúe manifestándose indefinidamente? Es decir, si se incrementara la concentración en el medio de crecimiento del tóxico frente al que se ha adquirido resistencia ¿es posible que también vaya incrementándose la capacidad de adaptación del microorganismo mutando nuevamente? Si la respuesta a este interrogante fuera afirmativa, surge inmediatamente otra incógnita: ¿dónde está el límite si es que éste existe? Conocer las capacidades de adaptación de los organismos del fitoplancton a los cambios ambientales es un reto abierto a la comunidad científica no exento de dificultad, pero de cuya resolución puede que dependa nuestro futuro (Whipple *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2012).

La posibilidad de determinar los límites de la adaptación del fitoplancton a algunos contaminantes fue otro de los pilares importantes de la presente tesis, lo que se concretó en su **tercer objetivo**. Para conseguirlo se empleó un abordaje de laboratorio denominado “trinquete” o *ratchet* que consigue obtener la máxima respuesta a la selección en un sistema experimental, que potencia, simultáneamente, la selección natural y la aparición de nuevas mutaciones en las poblaciones.

- En el primer apartado de este tercer capítulo, se presenta un trabajo editado como capítulo de libro. En esta publicación, además de recogerse una revisión de la experimentación realizada por el grupo de investigación en estos últimos años, se incluyen los resultados obtenidos con el experimento de *ratchet*, frente al sulfato de cobre, en la cianobacteria tóxica *M. aeruginosa*. De forma complementaria, también se presentan los resultados del procedimiento de *ratchet*, aplicado a dicha microalga y otras dos especies de clorofitas comúnmente presentes en los ecosistemas continentales: *S. intermedius* y *D. chlorelloides*. Dicho metal pesado se seleccionó por haber sido ampliamente utilizado en el control de la proliferación

incontrolada de microalgas, especialmente para prevenir las floraciones algales masivas de cianobacterias tóxicas, entre las que destaca *M. aeruginosa*.

- En el segundo apartado se presenta un trabajo experimental realizado durante la estancia predoctoral en el Australian Institute of Marine Science (AIMS) situado en Townsville, Australia, gracias a la subvención del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD) para becarios y contratados predoctorales del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU). En este caso, se estudió la máxima capacidad de adaptación de una cepa del dinoflagelado endosimbionte de los corales, *Symbiodinium* Cepa C1, frente al aumento de la temperatura. Los efectos del aumento de la temperatura en el planeta son especialmente visibles en los ecosistemas marinos. Un ejemplo de especial singularidad e importancia por presentar una gran vulnerabilidad a este fenómeno derivado del cambio climático se encuentra en la Gran Barrera de Coral australiana. Los arrecifes de coral deben su éxito funcional a la simbiosis con dinoflagelados intracelulares del género *Symbiodinium* (zooxantelas) que suministran hasta el 95 % de las necesidades energéticas del coral (Muscatine & Porter, 1977). La capacidad de los arrecifes de coral para sobrevivir a los aumentos de la temperatura depende, en gran medida, tanto de la capacidad de los corales cómo de la de sus hospedadores para adaptarse al incremento de la temperatura ambiental. Bajo condiciones ambientales estresantes, como lo es la más alta temperatura del agua, esta simbiosis puede romperse y los dinoflagelados se pierden en un proceso conocido como "blanqueamiento" (*bleaching*). Un hecho constatado en los últimos años es un crecimiento del número de este tipo de episodios de "blanqueamiento". Debido a que la termo-tolerancia de los corales está fuertemente influenciada por la capacidad de adaptación al incremento de la temperatura que presenten sus hospedadores *Symbiodinium* (Mieog *et al.*, 2009), se consideró de interés primordial intentar obtener un nuevo mutante más termo-resistente, que pudiera desplazar los genotipos originales y conferir resistencia al coral. Con este objetivo, además de acometer el correspondiente procedimiento de *ratchet* con la cepa *Symbiodinium* C1, se intentó conseguir mutantes

resistentes a la temperatura letal de 32,2 °C mediante el análisis de fluctuación.

Los resultados obtenidos en el primer apartado del capítulo, mostraron diferente capacidad de adaptación entre la cianobacteria procariota *M. aeruginosa* y las clorofitas eucariotas *S. intermedius* y *D. chlorelloides*, demostrando que el nivel de organización celular puede ser un factor determinante en el límite adaptativo de los organismos.

En lo referente, a la adaptación de *Symbiodinium* Cepa C1 fue imposible obtener mutantes resistentes a la temperatura de 32,2°C, debido a que en todos los cultivos que alcanzaban dicha temperatura se observaban nulos crecimientos y eficiencias fotosintéticas en un plazo de 2 semanas. Este hecho fue apoyado por el resultado obtenido en el análisis de fluctuación, donde ninguno de los dos sets que componen el experimento mostró crecimiento tras un periodo de 60 días, demostrando que no hubo adaptación a dicha temperatura. Sin embargo, a la temperatura de 31,5 °C los replicados del *ratchet* se aclimataban fisiológicamente mostrando un raro ejemplo en el que un límite térmico vital casi se superpone con un límite térmico para el crecimiento y la reproducción.

- **Adaptation of cyanobacteria to anthropogenic and natural stress: the role played for spontaneous mutation**

Stress Biology of Cyanobacteria (Chapter 16)

Ed.: A. Kumar, A. Nath and B.A. Neilan

CRC Pres. Taylor & Francis Group LLC. 2013

ISBN: 13: 978-1-4665-0478-3

16 Adaptation of Cyanobacteria to Anthropogenic and Natural Stress

The Role Played for Spontaneous Mutation

*Raquel Gonzalez, Camino García-Balboa,
Eduardo Costas, and Victoria Lopez-Rodas**

CONTENTS

16.1 Introduction	307
16.2 Materials and Methods	309
16.2.1 Fluctuation Test	309
16.2.2 Equilibrium State	312
16.2.3 Ratchet Protocol (Testing Limitations)	312
16.3 Results and Discussion	313
16.3.1 Example Cases of Genetic Adaptation of Cyanobacteria	313
16.3.2 Limits of Genetic Adaptation to Contaminants	315
16.4 Conclusions	317
Acknowledgments	318
References	318

16.1 INTRODUCTION

Stromatolites of fossilized oxygen-producing cyanobacteria have been found from at least 2.8 billion years ago, possibly as far back as 3.5 billion years ago. In contrast to other organisms whose final destination was extinction, cyanobacteria can be found in almost every conceivable environment: from oceans to fresh water and bare rock to soil. Accordingly, these organisms have had to survive global extinction of many species as well as several environmental crises. Presently there are numerous extreme natural environments that support growth of vast community of cyanobacteria. However, some questions yet remain unanswered, such as: how have cyanobacteria achieved the adaptation mechanisms to survive and proliferate under complicated stressful conditions?

Cyanobacteria must defend themselves against diverse types of selective pressures resulting from natural phenomena. Nowadays, changes in environmental conditions are occurring at an unprecedented rate as a result of large-scale changes caused by human activities. The massive loss of diversity, homogenization of biotas, proliferation of opportunistic species, and unpredictable emergent novelties can be considered among the distinctive features of the future biosphere [1]. During the

* Corresponding Author: vlrodas@vet.ucm.es.

last century, the disappearance rate of species was estimated to be 500-fold higher than had been the case over the preceding centuries, giving rise to an annual extinction of 30,000 species out of the 11 million currently estimated [2]. The species' collapse can be mainly attributed to the incapacity of organisms to cope with drastic environmental changes occurring in their habitats [3].

AQ1 Freshwater reservoirs, lakes, rivers, coastal, and ocean areas receive considerable amounts of anthropogenic pollutants that alter the chemical balance and biogeochemical cycles and appear to be a major cause of the biodiversity crisis [4,5]. The impact of these toxic compounds on biodiversity threatens all ecosystems, being particularly significant in those characterized by a slow response to change, such as aquatic systems.

The productions and emissions of pollutants are usually derived from human settlements, resource uses, and interventions, such as infrastructural development and construction, agricultural activities, industrial developments, urbanization, tourism, etc. Contaminants of major concern include: persistent organic pollutants, nutrients, oils, radionuclides, heavy metals, pathogens, antibiotics, sediments, litter, and debris, etc. [6]. For example, herbicides like DCMU and glyphosate are among the most significant anthropogenic pollutants in aquatic ecosystems [7]. Similarly, antibiotics like erythromycin are widely used in modern agriculture and aquaculture activities in many developed nations and released in various habitats [8]. Several algaecides including copper sulfate, are used to control algal blooms of water reservoirs meant for human use [9].

Phytoplankton is the autotrophic component of the plankton community. This group includes prokaryotic (cyanobacteria) and eukaryotic (microalgae) photosynthetic organisms that grow near the surface of the water column where they are able to capture light for photosynthesis. Despite their microscopic size, phytoplankton is responsible for about half of the global primary production of oxygen. These organisms also drive essential biogeochemical cycles and export massive amounts of carbon to deep waters and sediments in the open ocean. In addition, they have a strong influence in the water-atmosphere gas exchanges [10], so the repercussive impact on phytoplankton populations will undoubtedly affect the rest of the components of the trophic web. These environmental changes affect the abundance of the aquatic biota, as they are exposed to unprecedented scenarios. However, phytoplankton can be highlighted as a likely target to experience this environmental pressure but little is known about the mechanism of functioning within these organisms under such extreme conditions.

Within limits, organisms may survive in stressed environments as a result of two distinct processes. First, the majority of cyanobacteria have an incredible phenotypic plasticity to acclimate to modifications in environmental parameters and are able to survive in adverse habitats as a result of physiological acclimation, usually resulting from modifications of gene expression [11,12]. However, when changes in environmental conditions exceed physiological limits, survival is determined exclusively on adaptation by natural selection if mutations provide the appropriate genetic variability and confer resistance [13]. The neo-Darwinian view that evolutionary adaptation occurs by selection of preexisting genetic variation was accepted early in multicellular organisms [14]. However, recent evolutionary studies in bacteria have suggested that hypothetical "adaptive mutation" could be a process resembling Lamarckism wherein the absence of lethal selection produces mutations that relieve selective pressure [15,16]. The key to resolving this postulation is to know the preadaptive or post-adaptive origin of new mutations. Surprisingly, there are almost no studies that have made a direct connection between the rates of origin of favored mutants and the process of adaptation [17]. The main reason for this lack of studies is the difficulty in measuring the rate of favored mutants directly in diploid, multicellular, sexual organisms living in well-defined populations. On the contrary, most microbes (including cyanobacteria and many microalgae) are unicellular, asexual organisms and have only one copy of genetic material and their populations comprise countless cells [18]. Therefore, the study of genetic adaptation of cyanobacteria is a clear approximation to the problem of the origin of favored mutants and the process of adaptation.

In this study, our framework was focused on evaluating, from an evolutionary point of view, the mechanisms involved in the adaptation of cyanobacteria to sudden environmental changes arising from novel anthropogenic pollutants or extreme natural environments. For this purpose, an

experimental technique such as fluctuation analysis was rigorously performed [19]. In addition, we have assessed the mechanisms (fitness and mutation–selection balance) that allow cyanobacteria to withstand continuous exposure to contaminants. Finally, the ratchet protocol constitutes a novel way to explore, through a rigorous experimental model, the limits of genetic adaptation in cyanobacteria to adapt to increasing anthropogenic-induced changes in environmental conditions.

16.2 MATERIALS AND METHODS

16.2.1 FLUCTUATION TEST

Fluctuation analysis is the best experimental model to demonstrate if the adaptation to lethal doses of toxic compounds or to natural forcing could take place in wild strains of cyanobacteria. Furthermore, this technique is particularly well suited to discriminate between cells that become resistant due to either: (a) acquired specific adaptation in response to the anthropogenic or natural stress (including both physiological adaptation or acclimation, and possible mutations following the exposure), and (b) resistant cells arising from rare spontaneous mutations that occur randomly during growth of cyanobacteria prior to the exposure to the selective agent.

A modified Luria–Delbrück fluctuation analysis using liquid cultures was used to investigate the occurrence of resistance (Figure 16.1) [20,21]. The modification involves the use of liquid medium (BG11 medium for freshwater algae and cyanobacteria [Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany]) containing the selective agent instead of plating bacterial cultures on a solid medium, as done by Luria and Delbrück [19].

AQ2 For correct interpretation of the results, two different sets of cultures were managed. In the first set (set 1, Figure 16.1a), cultures flasks (ca 100), containing nonselective culture medium, were inoculated with $N_0 = 10^1$ – 10^2 wild-type cells, a number small enough to reasonably ensure that no preexisting mutants were present. The cultures were grown under nonselective conditions until they reached $N_t = 10^6$ – 10^8 , and thereafter supplemented with a lethal dose of the selective agent used in this study. The dose was previously calculated from a dose–growth rate relationship, and a dose 2–4 times higher than those which showed 100% inhibition of growth was selected.

For set 2 (control, Figure 16.1b), 25–50 flasks were inoculated each with $N_t = 10^6$ – 10^8 cells originating from the same parental population used in set 1 experiment. In this case, cells were directly supplemented with selective medium containing the dose as used in set 1 experiment. Both sets of cultures were kept under selective conditions for a period of time long enough to allow resistant cells to grow (usually 75–90 days). Flasks were placed at 22°C under a continuous photon flux density of $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm provided by cool white fluorescent tubes. At the end of the experiments, the number of resistant cells in both sets was counted using a Beckman (Brea, CA) Z2 particle counter.

Analysis of data showed two different results in the set 1 experiment, each of them could be interpreted as the independent consequence of two different phenomena of adaptation [19,22]. In the first case, if resistant cells appeared by specific post-selective mutations or physiological adaptation, every cell is likely to have the same opportunity of developing resistance and cells per culture variance would be low (Figure 16.2, set 1A). Consequently, interculture (flask-to-flask) variation should be consistent with the Poisson model (and so, variance/mean ≈ 1). By contrast, if resistant cells arise before the exposure (i.e., genetic adaptation by rare spontaneous mutation occurring during the time in which the cultures grew to N_t from N_0 before selection), then the flask-to-flask variation would not be consistent with the Poisson model (i.e., variance/mean > 1). Obviously, results may differ (0 resistant cells in each culture), indicating that neither selection by spontaneous mutations had occurred prior to exposure nor specific adaptation during the exposure had taken place.

AQ3 The set 2 cultures were experimental controls of the fluctuation analysis. Either way, resistance appears variance is expected to be low, because set 2 samples the variance of the parental population. If the variance/mean ratio of set 1 was significantly greater than the variance/mean ratio of set 2 (fluctuation), this would confirm that resistant cells arose by rare mutations that occurred

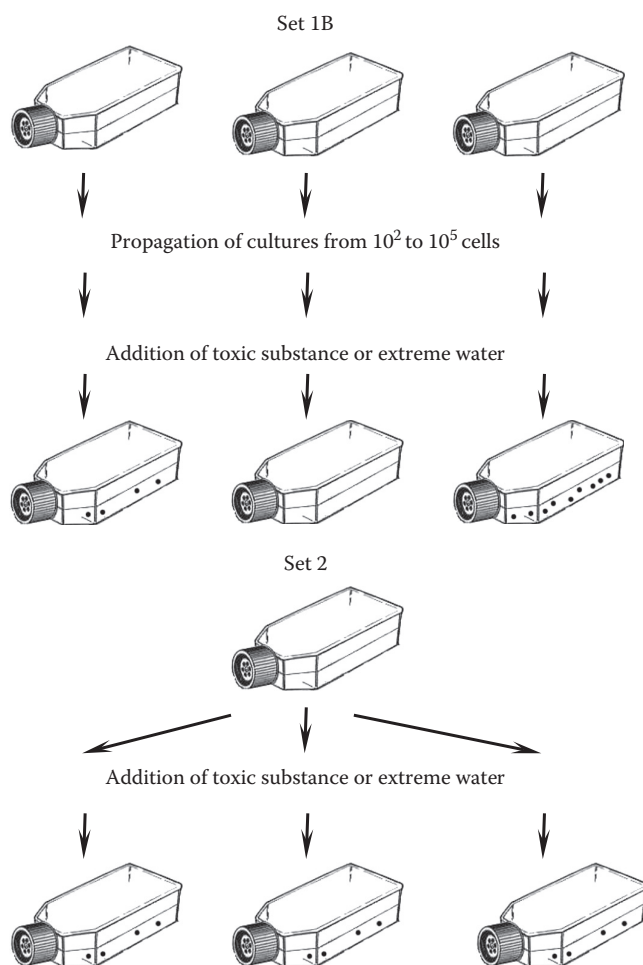


FIGURE 16.1 Schematic diagram of the modified Luria and Delbrück [19] fluctuation analysis. In the set 1, several cultures, each inoculated with small inoculums, were propagated until a high cell density was reached, and then a lethal dose of the toxic substance or extreme water was added. Set 1A: physiological adaptation (i.e., acclimation) or possible adaptive mutations. In this case, the number of resistant cells in all the cultures must be similar. Set 1B: adaptation by mutations occurring in the period of the propagation of cultures, that is, before exposure to the selective agent. One mutational event occurred late in the propagation of culture 2 (therefore, the density of resistant cells found is low) and early in the propagation of culture 3 (thus, density of resistant cells found is higher than in culture 2); no mutational events occurred in culture 1. Therefore, the variance/mean ratio of the number of resistant cells per replicate must be >1 . Set 2 samples the variance of parental populations as an experimental control. In this case, the number of resistant cells in all the cultures must be similar (the distribution should be Poisson, with a variance approximately equal to the mean). (Modified from Luria, S. and Delbrück, M., *Genetics*, 28, 491, 1943.)

before the exposure to the pollutant or to the water samples from extremely stressful ecosystems. By contrast, if a similar variance/mean ratio between set 1 and set 2 was found, it would confirm that resistant cells arose during experimental exposure.

In addition, the fluctuation analysis also allows estimation of the rate of appearance of resistant cells. There are different approaches for accomplishing this estimation [23]. Due to methodological limitations imposed by fluctuation analysis using liquid cultures, the proportion of cultures from set 1 showing no resistant cells (P_0 estimator) was used to calculate the mutation rate (μ) using the following equation:

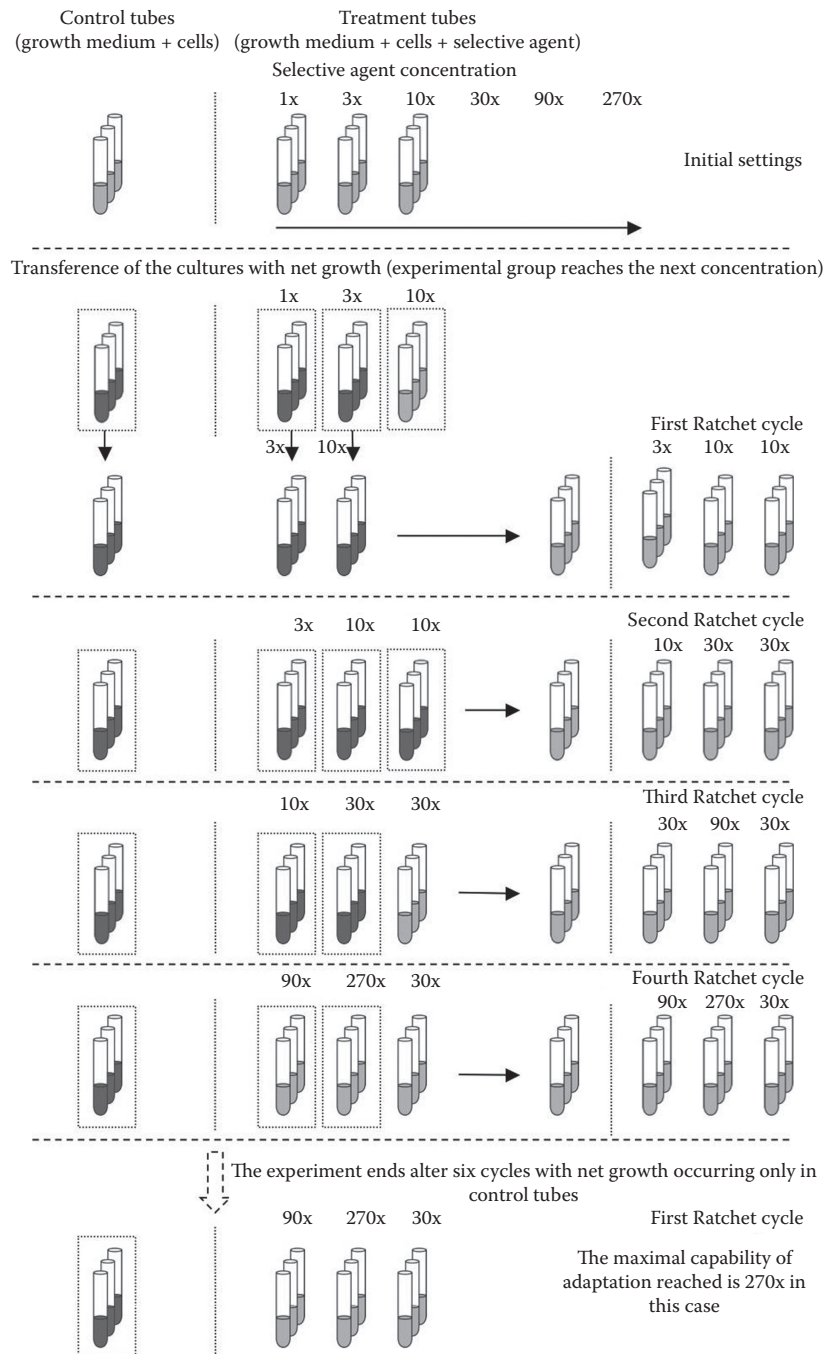


FIGURE 16.2 Schematic representation of the ratchet experimental design. Three replicates of the control cultures and three replicates of cultures for each of the three initial doses of the selected agent are present in each ratchet cycle. Each tube is transferred to the next concentration when the same net growth as the control tubes is reached (these tubes are represented as framed in the figure). Tubes that do not present net growth are maintained at the same concentration. A new ratchet cycle is considered each time the control tubes are transferred. The experiment ends after six cycles with net growth occurring only in the control tubes. At this point, the maximal capability of adaptation corresponds to the maximal concentration of the selective agent that presents net growth.

$$\mu = \frac{\text{Log}_e P_0}{(N_t - N_0)}$$

where N_0 and N_t were the initial and final cell population size, respectively.

16.2.2 EQUILIBRIUM STATE

If mutation from wild-type, sensitive allele to resistant cells is recurrent, new mutants may develop in each generation, and resistant alleles become detrimental to fitness when the selective agent is not present in the medium. Obviously, most of these mutants would be eliminated eventually by natural selection, if not by chance. At any given time, there will be a certain number of resistant cells that have not yet been eliminated. According to Kimura and Maruyama [24], the balance between μ and the rate of selective elimination (s) will determine the average number of such mutants, according to the equation;

$$q = \frac{\mu}{(\mu + s)}$$

where

q is the frequency of the resistant allele

s is the coefficient of selection calculated, according to the equation

$$s = 1 - \left(\frac{m_T^r}{m_T^s} \right)$$

where m_T^r and m_T^s are the Malthusian fitness of resistant and sensitive cells measured in nonselective conditions, respectively.

16.2.3 RATCHET PROTOCOL (TESTING LIMITATIONS)

When genetic adaptation is found via fluctuation analysis, the adaptation is referred to by a given lethal dose of the toxic substance (usually, two to three times higher than that causing 100% inhibition of growth). However, the potential limit of adaptation to the highest concentration of the toxic substance is difficult to estimate via fluctuation analysis, since stronger selection pressures drastically reduce population size. This constraint can be overcome by performing experiments that include several values of selection pressure. To this end, Reboud et al. [25] developed an experimental model aimed at evaluating the maximal potential for herbicide resistance evolution in the green microalga *Chlamydomonas*. This experiment was based on the use of different concentrations of herbicide, which, thereby, imposed different selection pressures. Furthermore, Orellana et al. [26] provided a modified procedure that allowed for maximizing the occurrence of mutants in microalgae and their selection by applying variable selection pressures. A significant refinement of this experimental procedure was achieved by using different replicates of each strain under each selection condition. This assures reproducibility and is referred as ratchet assays [27]. The protocol aims at reaching equilibrium between strong selection intensity by means of ratcheting to increase doses of the selective agent, and at maintenance of a population size large enough to increase probability of rare spontaneous mutation that confers adaptation. Cultures must be ratcheted only up to a dose that supports population growth. This experimental procedure is then applied in several independent replicates (Figure 16.2).

During the initial step, replicates of the control cultures containing growth medium and replicates of cultures for each initial doses of the treatment are prepared. All cultures are counted by a Beckman Z2 particle counter and kept under the selective conditions for 20 days and then observed. Each culture is transferred to the next concentration when the same net growth of the control cultures has reached; cultures that do not present net growth are maintained at the same concentration. A new ratchet cycle is concluded each time the control cultures are transferred. The experiment ends after several cycles when net growth occurs only in the control cultures. At this point, the maximal capability of adaptation corresponds to the maximal concentration of the selective agent that presents net growth. Data are analyzed employing the classic equations of Novick and Szilard [28]. The following equations are used:

AQ4

$$N_t = N_0 2^{t/T}$$

$$g = t/T$$

where

N_t is the number of cells at time t

N_0 is the number of cells at time 0

t is the time

T is the generation time

g is the number of generations, which are used to estimate the number of generations during the ratchet experiments

16.3 RESULTS AND DISCUSSION

16.3.1 EXAMPLE CASES OF GENETIC ADAPTATION OF CYANOBACTERIA

Cyanobacteria are a very important segment as primary producers of aquatic ecosystems but are frequently exposed to diverse types of anthropogenic agents. Henceforth, the tolerance of these organisms to stressed environments is an important subject as it carries an ecological price tag. Numerous resistant mutants have been reported in cyanobacteria especially against herbicides [7]. However, the empirical evidence for the appearance of resistant mutants in cyanobacteria from wild types by spontaneous mutations has only been addressed recently by fluctuation analysis (Table 16.1).

During the last 10 years, we have analyzed the adaptation of cyanobacteria to numerous anthropogenic pollutants (herbicides, antibiotics, heavy metals, and others) [20,29,30] and to diverse types of extreme environments distributed throughout the world [31–35]. In particular, when cultures of cyanobacteria were exposed to the selective agent, their number drastically decreased in both experimental set 1 and set 2, most probably due to death of sensitive cells by the lethal effects of the exogenously added test substances. However, after prolonged incubation lasting for several weeks, the fraction of cultures increased in density in the set 1, apparently due to growth of resistant variants. By contrast, all cultures of set 2 showed recovery, and resistant cells were prevalent in all culture flasks. Additionally, less resistant cell fluctuation was observed in set 2 (variance/mean < 1, consistent with Poisson variability), which indicates that the high fluctuation found in set 1 cultures may result from processes other than sampling error. As in set 1 cultures, the variance significance exceeded the mean (variance/mean $\gg 1$); it may be inferred that resistant cells arose by rare, preselective spontaneous mutations occurring randomly during growth under nonselective conditions rather than by specific adaptation or post-selective mutations appearing in response to the selective agent.

Table 16.1 presents the data of the mutation rate from sensitive to resistances in two different species of cyanobacteria, namely, *Pseudoanabaena planktonica* and *Microcystis aeruginosa* against several

TABLE 16.1

Mutation Rate (μ), Coefficient of Selection, and Mutation–Selection Balance in the Genetic Adaptation by Different Microorganisms in the Presence of Different Substances

Anthropogenic Pollutants	Organisms	Mutation Rate (μ)	Coefficient of Selection (S)	Resistant Mutant Allele Frequency (q)
DCMU (30 μ M)	<i>Pseudoanabaena planktonica</i> ^a	2.4×10^{-6}	0.84	1.6×10^{-3}
Glyphosate (120 mg L ⁻¹)	<i>Microcystis aeruginosa</i> ^a	3.6×10^{-7}	0.83	6.5×10^{-4}
Erythromycin (10 mg L ⁻¹)	<i>Pseudoanabaena planktonica</i> ^a	2.1×10^{-6}	0.82	1.6×10^{-3}
Copper sulfate (Cu ²⁺ concentration of 10 μ M)	<i>Microcystis aeruginosa</i> ^a	1.76×10^{-6}	0.76	1.5×10^{-3}

^a Phytoplankton species obtained from the Algal Culture Collection, Genetics Laboratory, Veterinary Faculty, Complutense University, Madrid, Spain.

anthropogenic substances. A representative group of pollutants have been chosen, which included: DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) and glyphosate (both herbicides), antibiotics like erythromycin, and heavy metal like copper sulfate. Analysis of results showed that the mutation rates ranged from 0.36 to 1.76 mutants per 10⁶ cells per generation. Since mutation can be recurrent in each generation, new mutant cells may be seen arising continuously. One of the main characteristics of resistant mutants in comparison to the wild type (parent) is that the former has a significantly lower growth rate than the latter, as is evident by q values of Table 16.1. It is worth mentioning here that mutations usually imply an energetic cost that may affect the survival of adapting populations [36,37]. Obviously, most of the resistant mutants are eventually eliminated by natural selection [38]. At any given time, the balance between continuous appearance of mutants and their selective elimination determine the number of remaining resistant mutants in algal populations growing in the absence of the toxic substance. This may be the case in wild-type populations growing in nonpolluted waters. As such, the population would be predominantly a clonal line of sensitive genotypes accompanied by a very small fraction of resistant mutant clones. In summary, rare spontaneous mutations conferring resistance seem to be a novel means of ensuring survival of cyanobacteria in polluted waters. The primary production supported by cyanobacteria and microalgae could be significantly lower than the present value as a consequence of the diminished growth rate of resistant mutants in comparison to wild-type cells.

Toxic waters from extreme aquatic environments could be considered natural labs with a natural toxic gradient. In a way, it facilitates the understanding of the adaptive process that allows the survival of mesophilic cyanobacteria in these environments. These habitats are characterized by extreme values of pH, toxic mineral concentrations, temperature, salinity, and other stress factors that limit the survival of mesophilic cyanobacteria. However, despite its toxicity, these waters are able to support a diverse phytoplankton community. If the stressful conditions do not exceed the limits of the physiological tolerance of cyanobacteria, survival is considered to be the result of physiological adaptation (i.e., acclimation) supported by alteration of gene expression [11]. On the other hand, in extreme environments as characterized by values of ecological factors exceeding the physiological limits of cyanobacteria, survival would depend exclusively on adaptive evolution, which results from the occurrence of new mutations that confer resistance [15,18,31–35]. However, if the toxicity is extremely high, adaptation cannot occur by any mechanism.

In general, cyanobacteria have an exceptional ability to withstand extreme temperatures, dryness, and high salinities [39]. Almost all the waters examined had a common feature—they have

an extremely low pH—and cyanobacteria were not found in extreme acidic environments [40–45], suggesting a limit of 4.8 pH for growth and proliferation. This may be associated with the absence of ATPase transport and also with the peripheral location of the photosynthetic apparatus instead of chloroplast, as found in eukaryotic algae [41]. Nevertheless, several studies have reported the presence of cyanobacteria in some acid lakes having a pH of 2.9 from Germany [46]. Such organisms are called cyanellas, which are endosymbiotic cyanobacteria and live inside the host cell (eukaryotic algae). Host cells perform the same functions as the plastids [46]. The earlier assumption could be valid for unicellular cyanobacteria but not for endosymbiotic ones. To a certain extent, these findings correspond to our findings since *Microcystis aeruginosa* is also a unicellular organism.

In recent years, a number of studies of adaptation in several stressful environments around various parts of the world (i.e., Vulcano Island, southern Italy; Rio Tinto water, southwest Spain; diverse geothermal waters in Italy and Argentina; Agrio River-Caviahue Lake system Neuquén, Argentina) have been carried out. Table 16.2 shows the water characteristics and capacities of different organisms to adapt to certain extremophilic conditions of water based on the mutation rate (μ , mutants per cell per generation); the coefficient of selection against resistant mutant (s); and the frequency of the resistance allele (q), particularly in *Microcystis aeruginosa* during genetic adaptation to some geothermal waters, which have a neutral pH.

16.3.2 LIMITS OF GENETIC ADAPTATION TO CONTAMINANTS

Recent works have shown that taxonomic group, ploidy level, growth rate, and habitat preference are involved in the ability of the different groups of phytoplankton to adapt to a contaminant [27,47].

TABLE 16.2

Water Characteristics, Mutation Rate (μ), Coefficient of Selection, and Mutation–Selection Balance in the Genetic Adaptation to Different Extreme Waters in *Microcystis aeruginosa*

Water Origin	Water Characteristics	Mutation Rate (μ)	Coefficient of Selection (q)	Resistant Mutant Allele Frequency (q)
Agrio River (Argentina)	pH: ≤ 4 , 1 Extreme acidity from (SO ₂ , HCl and HF) Ca: 1250–100 mg L ⁻¹ Fe: 800–50 mg L ⁻¹ Si: 100–10 mg L ⁻¹ SO ₄ : 1200–100 mg L ⁻¹	No adaptation		
Vulcano island (Italy)	pH: 3.1 Sulphydic acid levels: 1.84 \pm 0.10 g L ⁻¹ T ^a : 30.3°C \pm 0.5°C	No adaptation		
Tinto River (Spain)	pH: 1.7–2.5 Fe: 0.4–20.2 g L ⁻¹ Cu: 0.02–0.70 g L ⁻¹ Zn: 0.02–0.56 g L ⁻¹	No adaptation		
Geothermal waters (Italy and Argentina)	pH: 2.5–7 [35]	1.1 \times 10 ⁻⁵ (pH: 6.5) 7.9 \times 10 ⁻⁶ (pH: 6.3) 2.7 \times 10 ⁻⁶ (pH: 7.7) 1.1 \times 10 ⁻⁶ (pH: 8.3)	0.93 0.86 0.92 0.78	1.2 \times 10 ⁻⁵ 9.2 \times 10 ⁻⁶ 2.9 \times 10 ⁻⁶ 1.4 \times 10 ⁻⁶

AQ5

TABLE 16.3
Adaptation Increase (Times) and Number of Generations Required to Obtain Adaptation

Cepa	Characteristics (Taxonomic Group, Habitat, Cell Division)	Sulfato de Cobre		Simazina	
		Adaptation Increase (Times)	g	Adaptation Increase (Times)	g
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i> ^a	Chlorophyta	270	230	90	300
	Continental	270	253	90	300
	Rapid	90	184	90	255
<i>Scenedesmus intermedius</i> ^a	Chlorophyta	270	240		300
	Continental	270	240		300
	Rapid	270	270		315
<i>Microcystis aeruginosa</i> (3D) ^a	Cyanobacteria	30	84	9	75
	Continental	10	48	9	120
	Moderate	10	48	9	93
<i>Microcystis aeruginosa</i> (6D) ^a	Cyanobacteria	10	36	9	90
	Continental	10	48	9	105
	Moderate	10	36	9	98
<i>Microcystis aeruginosa</i> (7D) ^a	Cyanobacteria	10	48	9	76
	Continental	10	48	9	76
	Moderate	10	36	9	75
<i>Tetraselmis suecica</i> ^a	Chlorophyta	—	—	10	150
	Coastal		—	1.0	165
	Rapid			10	150
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> ^a	Bacillariophyta	—	—	4.5	150
	Coastal		—	4.5	165
	Rapid		—	4.5	150
<i>Emiliana huxleyi</i> ^a (CCMP371)	Haptophyta	—	—	1.5	36
	Oceanic		—	1.5	36
	Slow		—	1.5	32
<i>Emiliana huxleyi</i> ^a (CCMP372)	Haptophyta	—	—	1.5	32
	Oceanic		—	1.5	32
	Slow		—	1.5	36
<i>Emiliana huxleyi</i> ^a (CCMP373)	Haptophyta	—	—	3	40
	Oceanic		—	3	36
	Slow		—	3	X
<i>Isochrysis galbana</i> ^a	Haptophyta	—	—	1.5	40
	Oceanic		—	1.5	45
	Moderate		—	1.5	40
<i>Monochrysis lutheri</i> ^a	Haptophyta	—	—	1.5	45
	Oceanic		—	1.5	45
	Moderate		—	1.5	40

Cell division: rapid, one doubling every 2–3 days; moderate, one doubling every 3–4 days; slow, one doubling every 5–7 days.

^a Phytoplankton species obtained from the Algal Culture Collection, Genetics Laboratory, Veterinary Faculty, Complutense University, Madrid, Spain.

With taxonomic group, chlorophyta showed the strongest capacity to adapt to the highest levels of selection, while cyanobacteria did not adapt to that extent. This suggests that the difference results from the fact that prokaryotic organisms are more adversely affected by anthropogenic pollutants (especially herbicides) than eukaryotic species [48]. Several studies pertaining to adaptation have demonstrated that members of cyanobacteria are usually the most sensitive to certain pollutants as compared to eukaryotic microalgae [27,49]. This finding has been attributed to the overlapping of respiratory and photosynthetic electron transports in cyanobacteria, as both pathways share numerous electron transport intermediaries that are the target of the triazine herbicides [50]. Bacillariophyta and haptophyta are known to show from moderate to scarce ability to adapt, AQ6 respectively (Table 16.3).

From an ecological point of view, it is interesting to highlight that the clear differences in adaptation to different agents depend on the types of habitat. This is evident from the fact that the greatest adaptation ability was found in phytoplankters from epicontinental freshwaters comprising chlorophyta and cyanobacteria (usually the sink of arrays of several pollutants). In general, the recurrent presence of toxic substances in the environment has an effect on phytoplankton communities wherein sensitive organisms are excluded and resistant organisms are favored. Under such a condition, the tolerance of the population will be greater mainly due to the presence of resistant alleles in these populations [51]. In the same way but to a lesser magnitude, coastal marine microalgae are also exposed to anthropogenic agents as a result of river discharge and they exhibit intermediate adaptation abilities. Among all the groups, the most sensitive group is formed by oceanic microalgae species; these phytoplankton species live in habitats without pollutants and can therefore be more vulnerable to sudden exposures to pollutants than species inhabiting more contaminated regions. Thus, it can be hypothesized that the potential of phytoplankters to adapt to the toxic substances depends on previous evolutionary exposure history. Therefore, a sudden contamination episode could be relieved by freshwater phytoplankters but not by oceanic phytoplankters.

As a part of the differential ability of adaptation, the ratchet experiment allows investigation of whether the adaptation was by genetic mechanisms or by a physiological acclimation. In all the cases, it was observed that the adaptation to the highest selective pressure was by genetic mechanisms, as the time required for the acquisition of adaptation differed between replicates of the same species. Furthermore, the growth rate of the derived populations after the ratchet experiments was significantly lower than the growth rate in the ancestral populations prior to the ratchet experiments. Certain studies based on fluctuation analysis have also demonstrated the genetic origin of the resistant cells that appear when microalgae are exposed to simazine and copper sulfate, the same pollutants used in the ratchet experiments [30,52].

16.4 CONCLUSIONS

The present study demonstrates that it is possible to predict the response of cyanobacterial populations to global change by designing suitable experimental setups. By setting such experiments, it is possible to know the capacity of genetic adaptation in these microorganisms. Although there still remain many uncertainties concerning the impact of anthropogenic contaminants on cyanobacteria, rare spontaneous mutations conferring resistance against extreme natural waters or toxic compounds seem enough to ensure survival of cyanobacterial populations in polluted or toxic waters. Additionally, Ratchet protocol, despite being an oversimplification of reality, can be considered a novel way to explore the prevalence of genetic adaptation in cyanobacteria and other phytoplankton groups. It is also pertinent to mention that if the organisms are unable to adapt to an increasing pollution, this will undoubtedly cause shifts in the composition of the phytoplankton community and may replace the impaired individuals by resistant ones. An absolute scenario cannot be envisaged at this stage; nevertheless, genetics will surely determine the survival of the organisms to the environmentally driven selection.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been financially supported by the Spanish Ministry of Sciences and Innovation through the grants CTM2008- 05680 C02-01/MAR and CGL2008-00652/BOS. The authors thank the Ministerio de Educación y Ciencia for the financial support through the FPU program.

REFERENCES

1. Myers, N. and Knoll, A.H., The biotic crisis and the future of evolution, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 5389, 2001.
2. Woodruff, D.S., Declines of biomes and biotas and the future of evolution, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 5471, 2001.
3. Ramakrishnan, B. et al., The impacts of environmental pollutants on microalgae and cyanobacteria, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 40, 699, 2010.
4. Tilman, D., Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 5995, 1999.
- AQ7 5. Malato, S. et al., Degradación de plaguicidas, in *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)*, Blesa, M.A., Ed., Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogénea, La Plata, Argentina, 2001, Chap. 12.
6. Williams, C., Combating marine pollution from land-based activities: Australian initiatives, *Ocean Coastal Manag.*, 33, 87, 1996.
7. Koenig, F., Eukaryotic algae, cyanobacteria and pesticides, in *Algal Adaptation to Environmental Stresses, Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*, Rai, L.C. and Gaur, J.P., Eds., Springer, Berlin, Germany, 2001, p. 389.
8. Sarmah, A.K., Meyer, M.T., and Boxall A.B.A., A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere*, 65, 725, 2006.
9. Hrudey, S. et al., Remedial measures, in *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, Chorus, I. and Bartram, J., Eds., Routledge, London, U.K., 1999, 275.
10. Rost, B., Zondervan, I., and Wolf-Gladrow, D., Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: Current knowledge, contradictions and research directions, *Marine Ecol. Prog. Series*, 373, 227, 2008.
11. Bradshaw, A.D. and Hardwick, K., Evolution and stress—Genotype and phenotype components, *Biol. J. Linn. Soc.*, 37, 137, 1989.
12. Fogg, G.E., Algal adaptation to stress, some general remarks, in *Algal Adaptation to Environmental Stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*, Rai, L.C. and Gaur, J.P., Eds., Springer, Berlin, Germany, 2001, p. 1.
13. Belfiore, N.M. and Anderson, S.L., Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: A review, *Mutat. Res.*, 489, 97, 2001.
14. Sniegowski, P.D. and Lenski, R.E., Mutation and adaptation: The directed mutation controversy in evolutionary perspective, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 26, 553, 1995.
15. Cairns, J., Overbaugh, J., and Miller, S., The origin of mutants, *Nature*, 335, 142, 1988.
16. Foster, P.L., Adaptive mutation: Implications for evolution, *BioEssays*, 22, 1067, 2000.
17. Sniegowski, P.D., Linking mutation to adaptation: Overcoming stress at the spa, *New Phytol.*, 166, 360, 2005.
18. Margulis, L. and Schwartz K.V., *Five Kingdoms. An Illustrated Guide to the Phyla of Live on Earth*, 3rd edn., Freeman & CO, New York, 1998.
19. Luria, S. and Delbrück, M., Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance, *Genetics*, 28, 491, 1943.
20. López-Rodas, V. et al., Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations, *Eur. J. Phycol.*, 36, 179, 2001.
21. Costas, E. et al., Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: The ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea herbicide, *Phycologia*, 40, 391, 2001.
22. Jones, M.E., Thomas, S.M., and Rogers, A., Luria-Delbrück fluctuation experiments: Design and analysis, *Genetics*, 136, 1209, 1994.

23. Rosche, W.A. and Foster P.L., Determining mutation rates in bacterial populations, *Methods*, 20, 4, 2000.
24. Kimura, M. and Maruyama, T., The mutational load with epistatic gene interactions in fitness, *Genetics*, 54, 1337, 1966.
25. Reboud, X. et al., *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system for pro-active herbicide resistance evolution research, *Biol. J. Linn. Soc.*, 91, 257, 2007.
26. Orellana, G. et al., Biosensores basados en microalgas para la detección de contaminantes medioambientales, CT / ES2008 / 000465, 2008, P200701905, 2008.
27. Huertas, I.E. et al., Estimating capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: Herbicides will affect phytoplankton species differently, *New Phytol.*, 188, 478, 2010.
28. Novick, A. and Szilard, L., Chemostat on spontaneous mutations of bacteria, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 36, 708, 1950.
29. Lopez-Rodas, V., Flores-Moya, A., Maneiro, E., Perdigones, N., Marva, F., Garcia, M.E., and Costas, E., Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as a result of pre-selective mutations, *Evol. Ecol.*, 21, 535, 2007.
30. Garcia-Villada, L. et al., Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: Characterization and future implications in the use of copper sulphate as algicide, *Water Res.*, 38, 2207, 2004.
31. Flores-Moya, A. et al., Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through pre-selective mutations, *New Phytol.*, 166, 655, 2005.
32. López-Rodas, V. et al., Microalgal adaptation in the stressful acidic, metal-rich mine waters from Mynydd Parys (N Wales, U.K.) could be due to selection of preselective mutants, *Environ. Exp. Bot.*, 61, 43, 2008a.
33. Lopez-Rodas, V. et al., Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to the stressful acidic, mine metal-rich waters from Aguas Agrias Stream (SW Spain) as result of pre-selective mutations, *Chemosphere*, 72, 703, 2008b.
34. Costas, E. et al., How eukaryotic algae can adapt to Spain's Rio Tinto: A neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem, *New Phytol.*, 175, 334, 2007.
35. Costas, E., Flores-Moya, A., and Lopez-Rodas, V., Rapid adaptation of algae to extreme environments (geothermal waters) by single mutation allows "Noah's Arks" for photosynthesizers during the Neoproterozoic "snowball Earth"? *New Phytol.*, 189, 922, 2008.
36. Cousteau, C., Chevillon, C., and French-Constant, R., Resistance to xenobiotics and parasites: Can we count the cost? *Trends Ecol. Evol.*, 15, 378, 2000.
37. Vila-Auib, M.M., Neve, P., and Powles, S.B., Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants, *New Phytol.*, 184, 751, 2009.
38. Crow, J.F., and Kimura, M., *An Introduction to Population Genetics Theory*, Harper & Row, New York, 1970, p. 591.
39. Rai, L.C. and Gaur, J.P., *Algal Adaptation to Environmental Stresses*, 1st edn., Springer, Berlin, Germany, 2001.
40. Brock, T.D., Lower pH limit for the existence of blue-green algae: Evolutionary and ecological implications, *Science*, 179, 480, 1973.
41. Brock, T.D., *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*, 1st edn., Springer-Verlag, New York, 1978.
42. Knoll, A.H. and Bauld, J., The evolution of ecological tolerance in prokaryotes, *Trans. R. Soc. Edinburgh Earth Sci.*, 216, 227, 1989.
43. Albertano, P., Microalgae from sulphuric acid environments, in *Algae, Environments and Human Affairs*, Wiesneener, W., Schepf, E., and Starr, R.C., Eds., Biopress, Bristol, U.K., 1995, p. 19.
44. Gimler, H., Acidophilic and acidotolerant algae, in *Algal Adaptation to Environmental Stresses, Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*, Rai, L.C. and Gaur, J.P., Eds., Springer, Berlin, Germany, 2001, p. 291.
45. Nixdorf, B., Fyson, A., and Krumbeck, H., Review: Plant life in extremely acidic waters, *Environ. Exp. Bot.*, 46, 203, 2001.
46. Steinberg, C.E.W., Schäfer, H., and Beisker, W., Do acid tolerant cyanobacteria exist? *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 26, 13, 1998.
47. Rouco, M., Mecanismos genéticos y estrategias adaptativas a productores primarios (microalgas y cianobacterias) en un escenario de cambio global, PhD thesis, Complutense University, Madrid, Spain, 2011.
48. Fournadzhieva, S. et al., Influence of the herbicide simazine on *Chlorella*, *Scenedesmus* and *Arthrospira*, *Archiv. fuer Hydrobiol. Suppl. Band*, 106, 97, 1995.

49. Bañares-España, E. et al., Inter-strain variability in the photosynthetic use of inorganic carbon, exemplified by the pH compensation point, in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Aquat. Bot.*, 85, 159, 2006.
50. Campbell, D. et al., Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 667, 1998.
51. Blanck, H. and Dahl, B., Pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton in a gradient of tri-n-butyltin (TBT) contamination, *Aquat. Toxicol.*, 35, 59, 1996.
52. Marvá, F. et al., Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations, *Aquat. Toxicol.*, 96, 130, 2010.

AUTHOR QUERIES

- [AQ1] Please check whether the edit retains the intended meaning.
- [AQ2] Please specify part labels “a” and “b” in the caption and artwork of Figure 16.1. Also, specify Set 1A in the artwork.
- [AQ3] Please check the sentence “Either way, resistance appears...” for correctness.
- [AQ4] Please check whether the edit conveys the intended meaning.
- [AQ5] Please provide significance of superscript “a” in Table 16.2.
- [AQ6] Please check the inserted citation for Table 16.3 for correctness.
- [AQ7] Please check Ref. [5] for correctness and also provide publisher and page range for the same, if appropriate.

- **Investigación complementaria: Determinación de la máxima capacidad de adaptación de cianobacterias y clorofitas frente a dosis crecientes de sulfato de cobre.**

Investigación complementaria

Determinación de la máxima capacidad de adaptación de cianobacterias y clorofitas frente a dosis crecientes de sulfato de cobre

La eutrofización de los ecosistemas acuáticos ha aumentado la posibilidad de que se presenten proliferaciones de cianobacterias tóxicas en embalses y lagos (Camargo & Alonso, 2006). Por lo que, durante muchos años, en los depósitos de agua han venido siendo utilizados varios alguicidas con el fin de controlar dichas floraciones de microalgas tóxicas como, por ejemplo, las causadas por la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* (Kützing) (Hudrey *et al.*, 1999). La aplicación de diferentes tratamientos para el control de las floraciones de cianobacterias es crucial debido a que las cianotoxinas constituyen una grave amenaza para el consumo humano (Carmichael *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2009b) y la fauna salvaje (López-Rodas *et al.*, 2008a; Carmichael & Hui, 2006; Chen *et al.*, 2009a).

El sulfato de cobre o, en general, productos químicos que contienen cobre se vienen aplicando como biocidas desde el año 1900, estando destinados a impedir las floraciones de cianobacterias (Moore & Kellerman, 1904). Adicionalmente dichos compuestos son, también, las sustancias más utilizadas para el control del crecimiento del fitoplancton en la gestión de las aguas continentales (Wu *et al.*, 2007). No obstante, el cobre es un micronutriente esencial para el crecimiento de algas porque está involucrado en el transporte fotosintético de electrones y actúa como co-factor enzimático (Bossuyt & Janssen, 2004). Sin embargo, la presencia de altas concentraciones de cobre en el medio ambiente puede inducir efectos tóxicos en las algas afectando principalmente a la fotosíntesis, a la respiración, a la actividad enzimática y a la síntesis de pigmentos (Nielsen & Nielsen, 2005).

El amplio uso de sulfato de cobre durante décadas, junto con su larga persistencia en el medio ambiente hace que esta sustancia sea considerada como un contaminante residual en los ecosistemas acuáticos y, en particular, en depósitos de agua. Por lo tanto, la exposición continua de los microorganismos a este biocida durante su historia evolutiva reciente podría haber dado lugar a la selección de alelos resistentes

al cobre y el aumento de la persistencia de poblaciones de microalgas resistentes a dicho metal (García-Villada *et al.*, 2004).

Por ejemplo, ha sido comprobado, en algunos lagos Minnesota, que las cianobacterias parecen haber sido cada vez más resistentes a un alguicida con sulfato de cobre después de un tratamiento durante 26 años (Pimentel, 1971), posiblemente debido a la aparición de los genotipos resistentes. Además, cabe mencionar que, si los niveles de alguicidas exceden de los límites de la adaptación fisiológica, la supervivencia sólo estaría garantizada por el surgimiento de mutaciones espontáneas que confieran resistencia. A pesar de que muchos estudios se han ocupado de este fenómeno y se ha examinado la capacidad y los mecanismos de adaptación de diversos microorganismos frente a varios contaminantes ambientales (García-Villada *et al.*, 2004; López-Rodas *et al.*, 2007; Costas *et al.*, 2008; Sánchez-Fortún *et al.*, 2009a y 2009b; Marvá *et al.*, 2010, etc.), los estudios destinados a la evaluación de las dosis más altas de contaminantes que pueden resistir los organismos fitoplanctónicos son escasos y, solo muy recientemente, se han reportado algunos ensayos que determinan la máxima capacidad de adaptación (Reboud *et al.*, 2007; Huertas *et al.*, 2010).

Por lo tanto, el objetivo de esta parte del presente estudio complementario fue determinar la capacidad máxima de adaptación de algunas especies de fitoplancton de agua dulce (tres chlorophytas y tres cepas de cianobacterias) frente al sulfato de cobre, aplicando el denominado protocolo de *ratchet* que se basa, principalmente, en una exposición de los organismos experimentales a una presión de selección intensa que se mantiene largos periodos de tiempo.

RESULTADOS

Cálculo de la dosis-efecto

Inicialmente, antes de comenzar el experimento de *ratchet*, se estimaron las dosis tóxicas inhibitorias de los 100 % del crecimiento en las seis cepas ancestrales de genotipo salvaje utilizadas, empleando el protocolo experimental denominado curva de dosis efecto. Los resultados obtenidos son los reflejados en la tabla 6.III. Puede comprobarse que una concentración de sulfato de cobre de 2,5 μM ya era suficiente para

inhibir el 100 % del crecimiento en las tres cepas ancestrales de *M. aeruginosa* utilizadas. Por el contrario, fue necesaria una concentración de 12,4 μM para inhibir el 100 % crecimiento en las tres especies ancestrales de clorofitas.

Tabla 6.III. Concentración de sulfato de cobre que provocó la inhibición del 100 % del crecimiento en las poblaciones ancestrales, y en las poblaciones derivadas. Incremento de la adaptación una vez finalizado el experimento.

	Población ancestral (antes del experimento de <i>ratchet</i>)	Población derivada (después del experimento de <i>ratchet</i>)	Incremento de la adaptación (después del experimento de <i>ratchet</i>)
Chlorophyta (μM de CuSO_4)			
<i>D. chlorelloides</i> (Dc1M)	12,4	> 270	22
<i>S. intermedius</i> (Si1D)	12,4	> 270	22
<i>S. intermedius</i> (Si1A)	12,4	> 270	22
Cyanobacteria (μM de CuSO_4)			
<i>M. aeruginosa</i> (Ma3D)	2,5	> 30	12
<i>M. aeruginosa</i> (Ma6D)	2,5	> 10	4
<i>M. aeruginosa</i> (Ma7D)	2,5	> 10	4

Experimento de *ratchet*

Una vez concluido el experimento de *ratchet*, cuando se comparó el potencial de adaptación al aumento de las correspondientes dosis empleadas de sulfato de cobre en las diferentes especies de fitoplancton ensayadas, se encontraron notables diferencias, como puede constatarse con los resultados también recogidos en la tabla 6.III. Concretamente, las especies eucariotas mostraron una mayor capacidad de adaptación en relación con la cianobacteria *M. aeruginosa*. Por ejemplo, *D. chlorelloides* (con la excepción de una de las réplicas) y las dos cepas de *S. intermedius* fueron capaces de adaptarse hasta 270 μM de sulfato de cobre. Por el contrario, 10 μM de sulfato de cobre fue la concentración más alta que *M. aeruginosa* era capaz de resistir, aunque una de las réplicas de la cepa Ma3D llegara a mostrar un cierto crecimiento con 30 μM . Además,

también se observó una diferencia significativa entre la concentración de sulfato de cobre que causó la inhibición completa del crecimiento en la población ancestral (antes de los experimentos de “trinquete”) y en poblaciones derivadas (después de los experimentos de “trinquete”). Mientras que la resistencia al sulfato de cobre de las especies clorofitas aumentó casi 22 veces, la resistencia de las tres cepas de la cianobacteria *M. aeruginosa* aumentó sólo entre 4 y 12 veces (tabla 6.III).

La dinámica de los experimentos de trinquete también proporciona información adicional considerable. Debido a que cada réplica se desarrolla como una población independiente, las diferencias encontradas en las cepas, entre las diferentes réplicas, también pueden ser analizadas de forma independiente. En general, las tres repeticiones de la misma cepa mostraron diferentes patrones durante el experimento de “trinquete”, especialmente cuando se administraron las dosis más altas. Por ejemplo, la primera réplica de *D. chlorelloides* era capaz de crecer a 90 μM de sulfato de cobre después de 210 días, aproximadamente 161 generaciones (23 de 1 μM , 69 de 3 μM , 23 de 10 μM , 23 de 30 μM y 23 de 90 μM). Por el contrario, la segunda réplica requirió de 30 días más, aproximadamente 23 generaciones, para ser capaces de crecer a la misma concentración de sulfato de cobre. Por el contrario, la tercera réplica fue incapaz de adaptarse a 30 μM de sulfato de cobre (tabla 6.IV). Esta variación entre réplicas indica el efecto del azar en el proceso de adaptación.

6. RESULTADOS

Tabla 6.IV Tiempo en días (t) y número de generaciones (g) que se requieren para conseguir crecimiento en las dosis crecientes de sulfato de cobre durante el experimento de ratchet. (u: incapaz de adaptación después de 120 días).

Cepas	Réplicas	0 a 1 μM	1 a 3 μM	3 a 10 μM	10 a 30 μM	30 to 90 μM	90 a 270 μM	270 a 870 μM							
CHLOROPHYTA															
		t	g	t	g	t	g	t	g	t	g	t	g	t	g
<i>D. chlorelloides</i> (Dc 1M)	<i>No. 1</i>	30	23	30	23	30	23	90	69	30	23	90	69	u	-
	<i>No. 2</i>	30	23	30	23	30	23	90	69	60	46	90	69	u	-
	<i>No. 3</i>	30	23	30	23	30	23	u	-	60	46	u	-		
<i>S. intermedius</i> (Si 1D)	<i>No. 1</i>	30	23	30	23	30	23	90	69	60	23	90	69	u	-
	<i>No. 2</i>	30	23	30	23	30	23	90	69	60	23	90	69	u	-
	<i>No. 3</i>	30	23	30	23	30	23	90	69	60	23	90	69	u	-
<i>S. intermedius</i> (Si 1A)	<i>No. 1</i>	30	30	30	30	30	30	60	60	30	30	60	60	u	-
	<i>No. 2</i>	30	30	30	30	30	30	60	60	30	30	60	60	u	-
	<i>No. 3</i>	30	30	30	30	30	30	90	90	30	30	90	90	u	-
CYANOBACTERIA															
<i>M. aeruginosa</i> (Ma3D)	<i>No. 1</i>	30	12	30	12	60	24	90	36	u	-				
	<i>No. 2</i>	30	12	30	12	60	24	u	-						
	<i>No. 3</i>	30	12	30	12	60	24	u	-						
<i>M. aeruginosa</i> (Ma6D)	<i>No. 1</i>	30	12	30	12	30	12	u	-						
	<i>No. 2</i>	30	12	30	12	60	24	u	-						
	<i>No. 3</i>	30	12	30	12	30	12	u	-						
<i>M. aeruginosa</i> (Ma7D)	<i>No. 1</i>	30	12	30	12	60	24	u	-						
	<i>No. 2</i>	30	12	30	12	60	24	u	-						
	<i>No. 3</i>	30	12	30	12	30	12	u	-						

- **Investigación complementaria: Adaptación de *Symbiodinium* Cepa C1 al calentamiento global mediante el análisis de fluctuación y el *ratchet* modificado**

Adaptación de *Symbiodinium* Cepa C1 al calentamiento global mediante el análisis de fluctuación y *ratchet* modificado

El progresivo calentamiento que el planeta está sufriendo en la actualidad, como resultado de la acción antropogénica, es una preocupación que, muy especialmente, ha de ser tomada en cuenta. Se ha constatado que la velocidad con la que el clima de nuestro planeta está cambiando es muy superior a la acaecida en los anteriores 50 millones de años (Jansen *et al.*, 2007). Este fenómeno está produciendo unos efectos claramente visibles en los ecosistemas marinos y un claro ejemplo de ello es la Gran Barrera de Coral australiana, por la especial vulnerabilidad que presenta a cambios de este tipo.

Los corales son sensibles incluso a las pequeñas variaciones de temperatura, pudiendo desembocar en la ruptura de la obligada simbiosis entre las células de coral y los dinoflagelados endosimbiontes del género *Symbiodinium*, también conocidos como zooxantelas. Una consecuencia directa de dicha ruptura es un progresivo descoloramiento de los tejidos del coral debido a la pérdida de la zooxantela o de sus pigmentos, este proceso es conocido como blanqueamiento o *bleaching*. Durante los veranos, inusualmente calurosos, se observan amplios fenómenos de *bleaching* a lo largo de las barreras de coral repartidas por toda la geografía mundial y, en particular, la australiana, pudiendo causar grandes mortalidades en masa de los corales. En una escala mundial, los arrecifes de coral actuales han sufrido grandes reducciones en la cobertura coralina (Gardner *et al.*, 2003; Bruno & Selig, 2007; Sweatman *et al.*, 2011) y se estima que, en los próximos 10 - 20 años, el 15 % de todos los corales se encontrarán amenazados (Wilkinson, 2008). Estas observaciones indican que, a no ser que los corales sean capaces de adaptarse a las nuevas condiciones, se espera que en las próximas décadas ocurran mermas importantes de su biodiversidad.

Las zooxantelas se reproducen asexualmente *in hospite* (en el hospedador), mientras que se puede dar la reproducción sexual fuera de éste (Santos *et al.*, 2003; Correa & Baker, 2009). Las mutaciones somáticas (aquellas que tienen lugar durante los procesos de mitosis), que ocurren *in hospite* y derivan en un cambio fenotípico, son susceptibles de ser seleccionadas y, si la mutación es beneficiosa, el nuevo mutante (por ejemplo ser más termo-resistente) puede desplazar los genotipos originales de la colonia coralina. Estos procesos de selección positiva ya han sido reportados en otras

microalgas, incluidas dinoflagelados, observándose unas tasas de mutación de entre $1 \cdot 10^{-5}$ y $1 \cdot 10^{-7}$ (Flores-Moya *et al.*, 2008; Lopez-Rodas *et al.*, 2008a, 2008b, 2011; Costas *et al.*, 2008), lo que significa que si en el coral la zooxantela es capaz de crecer a concentraciones de alrededor de 1 millón de células por cm^2 de superficie coralina y, asumiendo tasas de mutación espontánea similares a las anteriormente reportadas, se espera que puedan ocurrir, en cada generación clonal de las poblaciones de zooxantelas que habitan por cada cm^2 de coral, de 0,1 a 10 mutaciones beneficiosas (aproximadamente una cada dos semanas). Esto sugiere que podría ser posible un número significativo de tales mutaciones beneficiosas dentro de una sola colonia de coral. Con el objetivo de poder encontrar las referidas mutaciones beneficiosas se realizó el protocolo de análisis de fluctuación y un experimento de *ratchet* modificado y así tener la posibilidad de obtener una zooxantela resistente a la temperatura que pudiera transmitir dicha resistencia al coral.

Análisis de fluctuación

Los resultados que se obtuvieron *Simbiodinium* Cepa C1 siguiendo el mismo protocolo de análisis de fluctuación ya presentado anteriormente en el presente documento, pusieron de manifiesto que, tras colocar los cultivos tanto del set 1 como del set 2 a la temperatura de 32,2 °C, no existió adaptación genética con el incremento de la temperatura, ya que todas las células presentes en los replicados murieron y, tras 60 días de incubación, no se observó crecimiento alguno en ninguno de ellos. Esta circunstancia hizo que se concluyera que la presión de selección fue tan extrema que no dio la posibilidad de obtener ningún mutante resistente a esa temperatura.

Experimento de *ratchet* modificado

Los resultados obtenidos se pueden resumir del siguiente modo: Todos los cultivos situados en las cámaras con una temperatura inferior a 32 °C, (a 26°, 28°, 29,8° y 31,5°) se mantuvieron en crecimiento exponencial y conservaron su eficiencia fotosintética; sin embargo, cuando se transferían a la cámara de 32 °C sufrían un colapso generalizado, el crecimiento decrecía, se producía la muerte de las células y la eficiencia fotosintética disminuía hasta llegar a anularse en todos los cultivos, siendo este proceso de deterioro celular de unas dos o tres semanas de duración.

Concretamente, en este caso, el protocolo de *rachet* se modificó aumentando el número de réplicas (16 en vez de 3) y de presiones selectivas (5 en vez de 3). El proceso experimental seguido se concretó con los siguientes pasos:

- 16 replicados a 26 °C

Constituyeron el control, en cada transferencia se seleccionaban 4 réplicas y se transferían a medio fresco con el fin de mantener la población en crecimiento exponencial y poder comparar el desarrollo de los replicados en las temperaturas problema con respecto al control.

Los primeros 4 replicados fueron transferidos alrededor de 20 días tras el inicio del experimento. La segunda transferencia se realizó al cabo de 40 días, la tercera transferencia transcurridos 60 días y la cuarta transferencia al cumplir los 80 días del comienzo del experimento (figura 6.1).

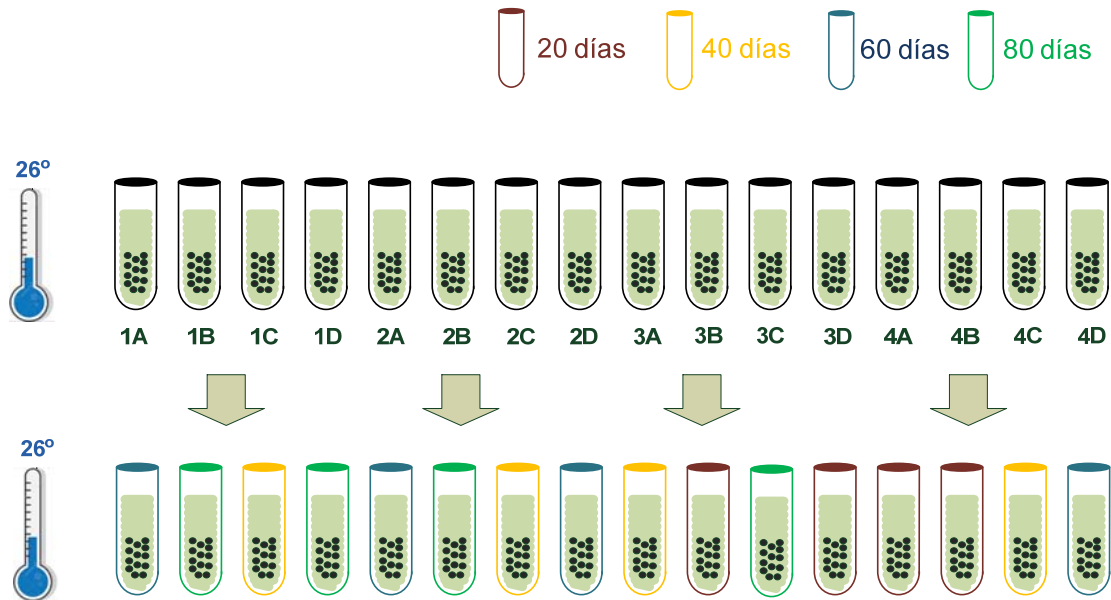


Figura 6.1 Representación esquemática de los replicados que comenzaron el ratchet a 26 °C.

- 16 replicados a 28 °C

$28^{\circ} \rightarrow 29,8^{\circ}$

Los 4 replicados más eficientes pasaron al segundo ciclo (29,8 °C) a los 20 días, los siguientes 4 a los 40 días, los siguientes a los 60 días y los últimos 4 a los 80 días.

$28^{\circ} \rightarrow 29,8^{\circ} \rightarrow 31,5^{\circ}$

Los cultivos que conseguían crecer a lo largo del experimento a 29,8 °C se transferían al siguiente ciclo de *ratchet* que correspondía a la temperatura de 31,5 °C.

$28^{\circ} \rightarrow 29,8^{\circ} \rightarrow 31,5^{\circ} \rightarrow 32,2^{\circ}$

Los cultivos que inicialmente comenzaron en 28 °C fueron transferidos al segundo ciclo (29,8 °C), cuando se adaptaron fueron transferidos al tercer ciclo (31,5 °C) y los que se consiguieron adaptar finalmente fueron trasladados al cuarto ciclo (32,2 °C) (figura 6.2).

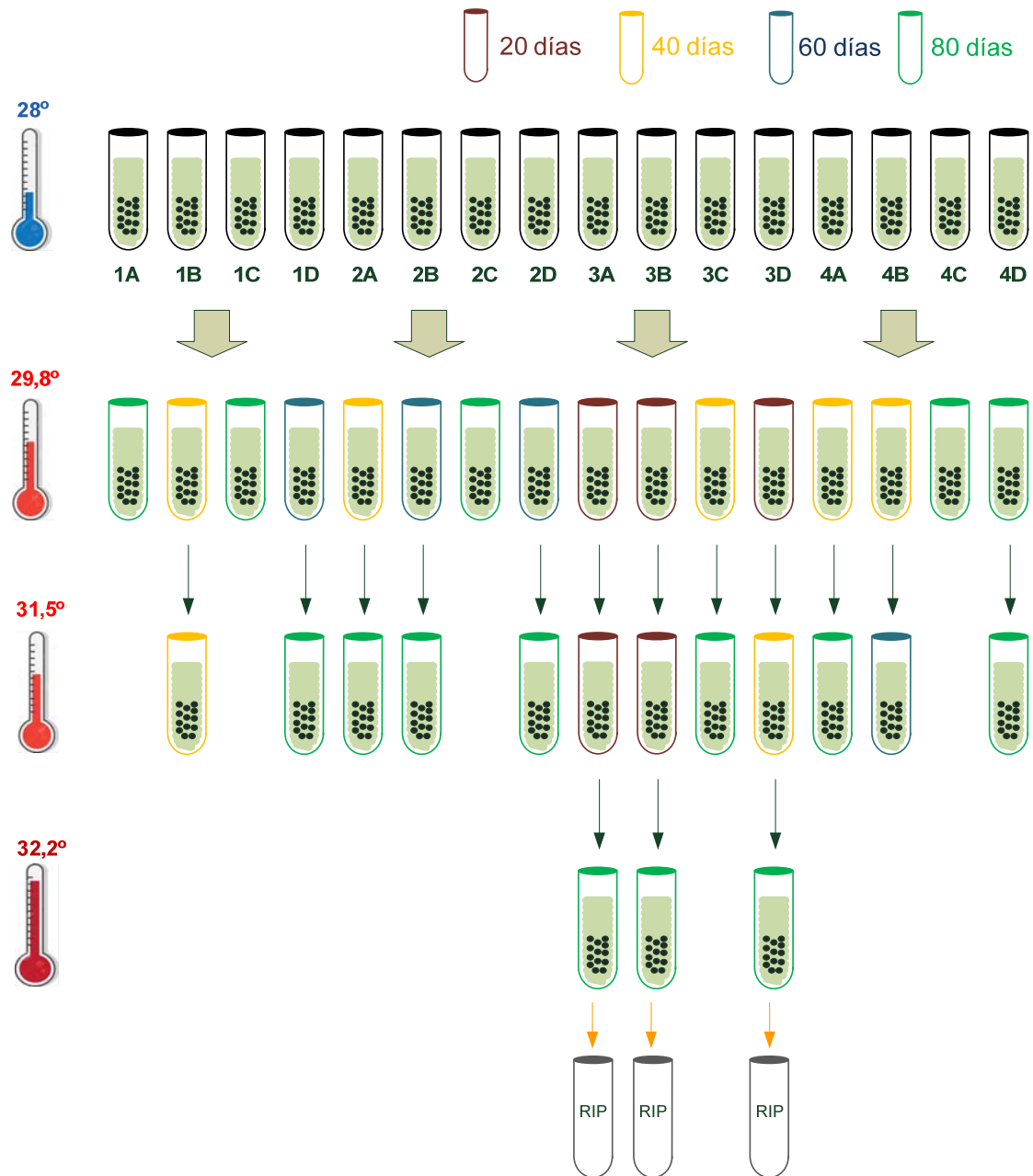


Figura 6.2 Representación esquemática de los replicados que comenzaron el ratchet a 28 °C.

- 16 replicados a 29,8 °C

29.8° → 31.5°

Los 4 más eficientes pasaron al segundo ciclo (31,5 °C) a los 20 días, los siguientes 4 a los 40 días, los siguientes a los 60 días y los últimos 4 a los 80 días.

$29.8^{\circ} \rightarrow 31.5^{\circ} \rightarrow 32.2^{\circ}$

Los cultivos que previamente habían sido transferidos a $31,5^{\circ}\text{C}$ a lo largo de las distintas transferencias y mostraban crecimiento y una buena eficiencia fotosintética eran transferidos a la cámara de $32,2^{\circ}\text{C}$ (figura 6.3).

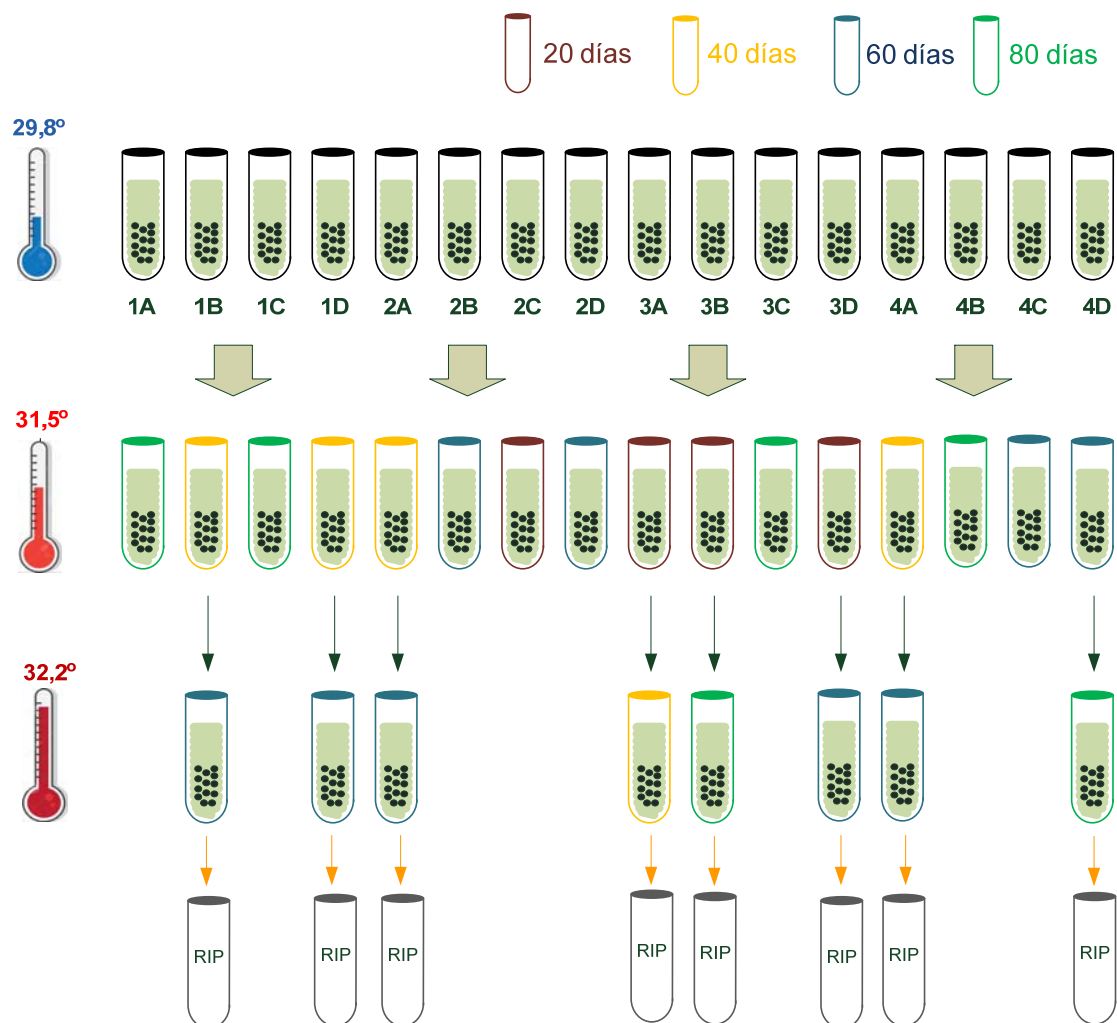


Figura 6.3 Representación esquemática de los replicados que comenzaron el ratchet a $29,8^{\circ}\text{C}$.

- 16 replicados a 31,5 C°

31,5° → 32,2°

Los 4 más eficientes pasaron al segundo ciclo (32,2 °C) a los 20 días, los siguientes 4 a los 40 días, los siguientes a los 60 días y los últimos 4 a los 80 días (figura 6.4).

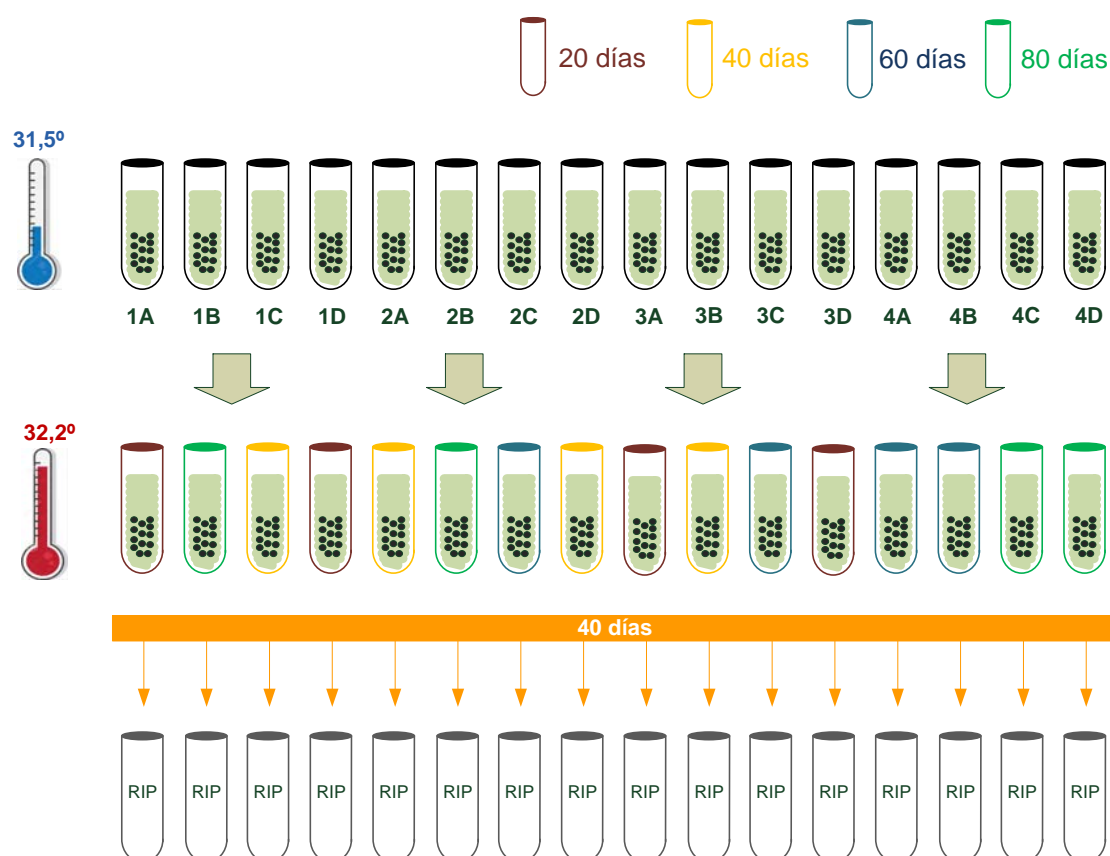


Figura 6.4 Representación esquemática de los replicados que comenzaron el ratchet a 31,5 °C.

- 16 replicados a 32,2 °C

Ni las 16 réplicas iniciales, ni ninguno de los cultivos procedentes de las anteriores temperaturas conseguían sobrevivir a 32,2 °C y, tras 2 o 3 semanas, se observaba crecimiento nulo y nula eficiencia fotosintética (figura 6.5).

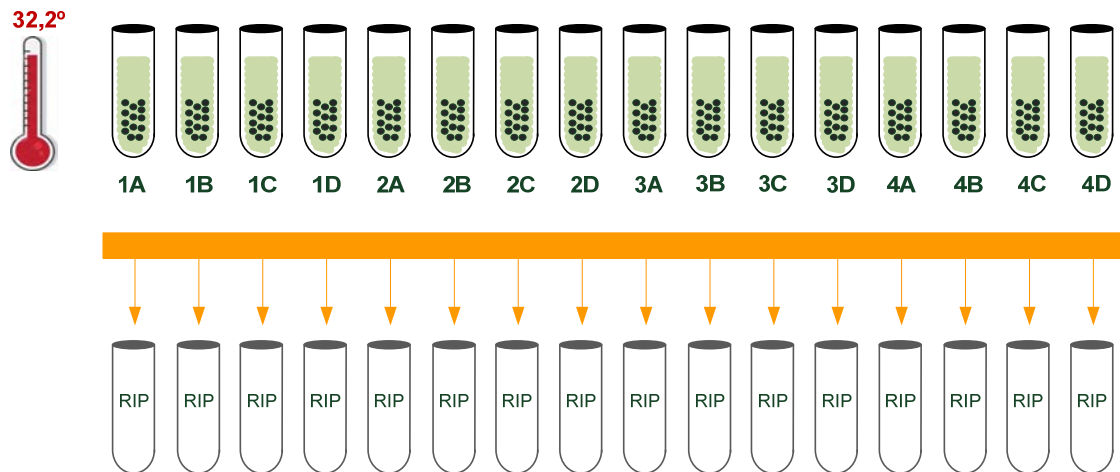


Figura 6.5 Representación esquemática de los replicados que comenzaron el ratchet a 32,2°C.

Mediante este procedimiento se pudo constatar que se llega a alcanzar una situación tal en la que, por más tiempo que se deje transcurrir, la especie no consigue adaptarse y sobrevivir, marcando así el límite superior de su capacidad de adaptación. Por lo que se puede concluir que la máxima capacidad de adaptación de *Symbiodinium* Cepa C1 se encuentra entre 31,5 y 32,2°C, ya que ninguna replica que alcanzó la cámara con la temperatura de 32,2°C, sin importar el diferente camino que hubiera seguido a lo largo de las diferentes temperaturas de las diferentes cámaras de cultivo, consiguió sobrevivir.



7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

Los organismos fitoplanctónicos han tenido que sobrevivir a muchos episodios catastróficos de pérdidas de biodiversidad y extinciones masivas a lo largo de la historia, como la huroniana (hace unos 2.700 a 2.300 Ma), cuyo nombre se debe a los estratos rocosos de la región del lago Hurón en Canadá, las neoproterozoicas (hace unos 750 a 580 Ma), probablemente las más intensas que haya habido nunca, cuando la Tierra llegó a convertirse en una gran “bola de nieve”, las grandes extinciones del Fanerozoico y, finalmente, las glaciaciones cíclicas registradas en las eras terciaria y cuaternaria tras las que, sin duda, comenzó la gran era del fitoplancton de nuestro “planeta azul”. Puede decirse que, en definitiva, el fitoplancton estaba preparado para sobrevivir a las condiciones más adversas e inimaginables.

A primera vista, las extinciones del pasado provocadas por factores físicos parecen tener poco o nada que decirnos acerca de la actual sexta extinción, la cual está plausiblemente causada por las actividades relacionadas con el hombre (Leakey & Lewin, 2008). Porque no hay duda de que los seres humanos son la causa directa del estrés de los ecosistemas y la destrucción de especies en el mundo moderno a través de actividades tales como la transformación del paisaje, la pérdida de biodiversidad, la polución, la introducción de especies exóticas, etc. (Martin, 1999). Y debido a que el *Homo sapiens* es claramente una especie animal (aunque con un comportamiento biológico y ecológico peculiar), la sexta extinción parece ser el primer evento registrado de extinción a nivel mundial que tiene una causa biótica, en lugar de una física (Elredge, 2001).

Hay numerosos indicios que demuestran que el cambio global antropogénico está afectando negativamente a los organismos fitoplanctónicos, principales productores primarios y base de la cadena trófica en todos los ecosistemas (Falkowski *et al.*, 2008), esto hace que el fitoplancton, nuevamente, tenga que adaptarse al cambio y hacer viable su continuidad en las nuevas condiciones climáticas que, con el transcurso de los próximos acontecimientos, se vayan produciendo. De lo contrario, las consecuencias derivadas de su alteración poblacional, o incluso extinción, no se harán esperar en los niveles tróficos superiores (Reusch & Boyd, 2013). Esta situación revela que el estudio

de los mecanismos evolutivos en los organismos fitoplanctónicos, los cuales son ampliamente abordados a lo largo de esta tesis, son de vital importancia para poder visionar y/o predecir los acontecimientos futuros.

Ha de puntualizarse que el desarrollo de las características actuales de las poblaciones es la consecuencia de la interrelación de las distintas fuerzas evolutivas implicadas, en primer lugar la adaptación, aunque no debe olvidarse la participación de la historia y la deriva o el azar. En este sentido, es prioritario el estudio de la importancia relativa de dichas fuerzas evolutivas en el desarrollo de las características actuales de las poblaciones relacionadas con las proliferaciones masivas, debido a los graves problemas que, especialmente las algas tóxicas, ocasionan en la salud de las personas y de los animales y, también, a las graves pérdidas económicas que llevan asociadas (Hoagland *et al.*, 2002). Con la base de este planteamiento, el primer capítulo está enfocado, principalmente, a la comprensión de los distintos contribuyentes en el desarrollo de la evolución de los organismos implicados en las floraciones masivas de algas en un escenario de cambio global; centrándose en dos caracteres de especial importancia en el desarrollo de *blooms*, por un lado, la tasa de crecimiento, uno de los principales componentes de la *fitness* (Flores-Moya *et al.*, 2008) y, por otro lado, la producción de toxina por célula, factor escasamente correlacionado con la *fitness* (López-Rodas *et al.*, 2006).

Los resultados encontrados plasman que la evolución de la tasa de crecimiento en ambas cepas de *A. minutum* (A11V y A12V) estuvo fuertemente marcada por la contingencia histórica, aunque cabe resaltar que la adaptación también estuvo involucrada. Del total del cambio registrado en la tasa de crecimiento debido a la adaptación, dos terceras partes se debieron a adaptación genética, es decir, a la selección de mutantes que presentaban una ventaja en el proceso adaptativo, mientras que un tercio se produjo debido a aclimatación fisiológica. El efecto selectivo del incremento de la temperatura y la ligera bajada del pH pareció ser suficiente para restringir la adaptación de todos los replicados experimentales, tal como indica la casi inapreciable contribución del azar, únicamente con un 5 % (Flores-Moya *et al.*, 2008; Rouco *et al.*, 2011). Los microorganismos empleados en esta experimentación solo se dividen mediante reproducción asexual, por lo que los cambios evolutivos solo pueden darse por nuevas mutaciones, que ocurran durante la propagación de las poblaciones derivadas en

las nuevas condiciones ambientales. De los resultados encontrados en el presente trabajo se deduce que existía un número alto de mutantes en cada replicado, justificado por el gran número de células que crecían en cada cultivo. Las mutaciones que incrementan la tasa de crecimiento fueron seleccionadas, desplazando el genotipo salvaje y las mutaciones que disminuyen la tasa de crecimiento fueron eliminadas progresivamente por la selección natural (Flores-Moya *et al.*, 2008).

La importante contribución de la historia sugiere que es la selección disruptiva la que podría haber operado en *A. minutum*, debido a las diferencias en los valores medios de la tasa de crecimiento entre las cepas que aumentó bajo las condiciones selectivas. La metáfora del “paisaje adaptativo”, una de las más ampliamente utilizadas de la biología evolutiva (Wright, 1932; Whitlock *et al.*, 1995; Colegrave & Buckling, 2005), puede aplicarse en este caso para explicar los diferentes valores de tasa de crecimiento encontrados entre A11V y A12V. Dicha metáfora se basa en el diferente trazado de la *fitness* de distintos fenotipos o genotipos en un determinado ambiente. La forma del “paisaje” es crucial para predecir el resultado de la evolución: si la evolución resulta en poblaciones que alcancen puntos finales predecibles o si por el contrario, la aparición de múltiples resultados evolutivos es más probable. En este caso, la selección natural condujo a las cepas a un proceso adaptativo final de picos que difieren en altura, indicando que se tomaron diferentes rutas para alcanzar los nuevos valores de tasa de crecimiento (Wright, 1932, 1988). No obstante, el patrón de selección disruptivo en la evolución de la tasa de crecimiento de *A. minutum* difiere del encontrado en otros modelos biológicos: en virus (Cuevas *et al.*, 2002), bacterias (Travisano *et al.*, 1995), en protozoos (Pérez-Zaballos *et al.*, 2005), en el dinoflagelado *Prorocentrum triestinum* Schiller (Flores-Moya *et al.*, 2008), en la cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa* (Rouco *et al.*, 2011) e, incluso, en organismos digitales (Wagenaar & Adami, 2004) en los que la selección era convergente, es decir, los valores de tasa de crecimiento de los distintos aislados se aproximaban al final del experimento. Sin embargo, en dichos modelos no se tiene en cuenta la variación estocástica que se produce en el origen de determinadas clases de mutantes beneficiosos entre las poblaciones replicadas, así como la secuencia temporal en la que estas mutaciones pueden haberse producido dando lugar a la divergencia (Lenski *et al.*, 1991; Cowen *et al.*, 2001). Además, conviene recordar que Wright en 1932 y posteriormente en 1988 (Wright, 1932, 1988) ya insistió en que los fenómenos de epistasis podrían modificar el valor selectivo de nuevas mutaciones

proporcionando diferencias en la *fitness*. Por último, los análisis moleculares desarrollados con el objetivo de determinar los fenómenos genéticos que subyacen a dicha convergencia han demostrado que ésta es sólo fenotípica porque las poblaciones derivadas suelen mostrar diferencias genéticas significativas entre ellos (Korona, 1996). En términos prácticos, los paisajes con muchos picos, como el encontrado en este caso, aumentan la imprevisibilidad del proceso evolutivo y, por tanto, los tiempos de cambios sin precedentes que se están produciendo provocarán que la predicción a largo plazo de las consecuencias de nuestras acciones sea mucho más complicada e inesperada.

Por el contrario, en el caso de la producción de toxina, su evolución se debió, fundamentalmente, a un fenómeno azaroso, permaneciendo asimismo la contingencia histórica. De acuerdo con las teorías neutralistas de evolución, en el azar se incluye la deriva genética (Crow & Kimura, 1970) y las mutaciones neutrales (Kimura, 1983). Los fenómenos de deriva genética son una consecuencia de los "errores de muestreo" cuando el número de individuos en la población llega a ser relativamente bajo en un momento dado (Crow & Kimura, 1970). Debido a que la densidad celular mínima alcanzada en los cultivos de *A. minutum* fue de, aproximadamente, de $2,5 \times 10^3$ células en 20 mL de medio de cultivo, se puede suponer que el papel del azar estuvo marcado mayormente por la aparición de mutaciones neutrales, más que por los fenómenos de deriva genética. Puesto que cada cultivo tenía un gran número de células, deberían de haber surgido numerosas mutaciones durante el crecimiento celular de cada cepa aislada. Algunas mutaciones aumentaron la producción de la toxina mientras que otras mutaciones la disminuyeron, lo que sugiere que el efecto de la selección para la producción de toxina en la población derivada fue neutral. Así pues, puede deducirse que ni el aumento ni la disminución de la producción de toxina tiene ventaja selectiva y es puramente fortuita, como también se demostró en el experimento con *M. aeruginosa* de Rouco y colaboradores (Rouco *et al.*, 2011). En general, caracteres débilmente asociados a la *fitness*, como es el caso de la toxicidad, suelen presentar heredabilidades altas (Mousseau & Roff, 1987) lo que indicaría que no supone gran importancia evolutiva (López- Rodas *et al.*, 2006). Consecuentemente, puede deducirse que la selección natural no fue lo suficientemente fuerte como para forzar la evolución de la producción de toxina en las cepas experimentales, manteniéndose el efecto de la historia bajo las nuevas condiciones ambientales.

La tasa de crecimiento y producción de toxina no están generalmente correlacionados en las distintas especies de dinoflagelados. Así, Guisande y colaboradores (Guisande *et al.*, 2002) demostraron que la tasa de crecimiento no tenía ninguna relación con la producción de toxina en *A. minutum*. La razón de la falta de relación entre la tasa de crecimiento y producción de toxina puede ser debido a que la síntesis de toxinas no es un componente constitutivo del metabolismo de las algas y éstas se sintetizan a partir de metabolitos de bajo peso molecular (Plumley, 1997), mientras que el crecimiento celular es un proceso mucho más trascendental y complejo. Actualmente aún no está claro por qué algunos dinoflagelados marinos producen toxinas y la ventaja adaptativa que esto les puede suponer (Graneli & Flinn, 2006).

A través del análisis global de los resultados en relación a los cambios observados en la tasa de crecimiento y en la cuota de toxina por célula bajo el escenario de cambio global, que supone un aumento de la temperatura y una disminución de pH, puede presuponerse que en un futuro próximo la aparición de mareas rojas producidas por *A. minutum* podría aumentar; sin embargo, la toxicidad de las células será impredecible. Por supuesto, hay que recalcar que el presente estudio es solamente una aproximación a la realidad, ya que no contempla la complejidad y variabilidad de la propia naturaleza e ignora, por ejemplo, todos los factores ecológicos implicados en el cambio global y la interacción entre miembros de distintas especies, circunstancias, por otro lado, que son imposibles de reproducir en el laboratorio. No obstante, el trabajo experimental realizado puede entenderse como una útil y nueva forma de explorar la evolución a largo plazo de las algas tóxicas.

En los capítulos II y III se planteó otra problemática a la que se enfrenta actualmente el mundo industrializado y es uno de los mayores retos medioambientales a los que, en los próximos años, habrá que dar una clara respuesta: la contaminación de suelos, sedimentos, ecosistemas acuáticos e incluso el aire, por la presencia de sustancias de elevada toxicidad de muy diversa índole, entre las que se encuentran los metales pesados y radionúclidos, pesticidas y, también, nanopartículas de muy diversa naturaleza, ejerciendo, cada una de ellas, una gran presión de selección sobre las poblaciones del fitoplancton (Bells & Collins, 2008). Si la concentración de estos compuestos tóxicos superara el valor letal para los organismos sensibles, el efecto inmediato sería su extinción local (Chevin *et al.*, 2010). No obstante, siempre es posible

que puedan surgir novedades evolutivas impredecibles, tales como la proliferación de cepas resistentes que aseguren la supervivencia de estos organismos en sus distintos ecosistemas (Myers & Knoll, 2001; Lohbeck *et al.*, 2012).

La clave para entender la adaptación de las microalgas a un medio ambiente contaminado, y poder comprender las estrategias que utilizan para sobrevivir en él, en condiciones muy adversas, radica en el análisis de los mecanismos que permiten la proliferación de raras variantes resistentes en condiciones letales (Hoffman & Sgrò, 2011; Bell, 2013). En ese sentido, el análisis de fluctuación puede suponer la mejor aproximación para esclarecer qué tipo de adaptación es la implicada en estos procesos (Rosenberg, 2001). Cuando las cepas experimentales seleccionadas en el caso de este estudio se cultivaron en un medio que contenía la dosis letal de cada una de las sustancias nocivas empleadas y agentes selectivos (hexaclorociclohexano o lindano, metales pesados de elevada toxicidad como tributylestano o TBT, plomo e iridio y la acción de elevar la temperatura), se pudo observar una destrucción masiva de células sensibles debido al efecto adverso de cada una de ellas. Sin embargo, después de incubar los cultivos durante un periodo de tiempo prolongado (60 - 75 días), muchos de ellos, de nuevo, aumentaron la densidad poblacional, como consecuencia del crecimiento de células resistentes al efecto tóxico del agente selectivo.

El análisis de fluctuación es el procedimiento adecuado para discriminar entre las células resistentes que aparecen debido a raras mutaciones espontáneas, las cuales ocurren al azar durante la replicación de los organismos de forma previa a la exposición al tóxico, y las células resistentes que aparecen por mecanismos de adaptación adquiridos inducidos por la propia exposición o a través de aclimatación, como resultado de las modificaciones de la expresión génica cuando las condiciones no exceden de los límites fisiológicos, es decir, cuando los cultivos están expuestos a concentraciones de tóxico inferiores a la dosis letal (Luria & Delbrück, 1943; Rosenberg, 2001).

En los diversos análisis de fluctuación realizados a lo largo de la experimentación realizada con el presente trabajo se ha observado un patrón común: una elevada fluctuación en el número de células resistentes en el experimento set 1, en contraste con la escasa fluctuación en el control o set 2. Estos hechos, inequívocamente,

demonstraron que dichas células resistentes aparecieron por mutaciones individuales espontáneas anteriores a la exposición y no como consecuencia de adaptaciones específicas para contrarrestar el efecto del contaminante. Por lo que se puede concluir que la adaptación genética debido a raras mutaciones espontáneas, fue el mecanismo que permitió a las microalgas estudiadas adaptarse a los diferentes agentes selectivos cuando las condiciones ambientales superaron los límites de la adaptación fisiológica. Podría decirse, por tanto, que este recurso de supervivencia es el *fuel* que permitirá mantener la producción primaria y el funcionamiento de los ecosistemas. Esta misma dirección apuntan los resultados que han sido reportados muy recientemente por otros muchos investigadores (Lohbeck *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2013). Sin embargo, y a pesar de que los datos obtenidos en los análisis de fluctuación son abrumadores, existe otra corriente de opinión que indica que la dispersión de los organismos y las especies pre-adaptadas serán la clave para la conservación del equilibrio del ecosistema, más que las nuevas variaciones genéticas que surjan en las poblaciones (Joint *et al.*, 2011).

Asimismo, los resultados obtenidos con los análisis de fluctuación sugieren que únicamente estaba implicado un gen en el proceso que aportó la resistencia, aunque en la bibliografía se recogen otros trabajos que consideran, más bien, que en la adquisición de resistencia pueden estar involucradas mutaciones hasta en siete u ocho genes (Kohler *et al.*, 1997). No obstante, en el caso particular analizado en este trabajo, si hubieran estado implicados varios genes hubiera sido imposible detectar crecimiento en los cultivos del set 1 debido a que la probabilidad de que se dieran varias mutaciones al mismo tiempo es muy escasa. Consecuentemente, la adaptación debido a mutaciones individuales es mucho más fácil y rápida que aquella en la que pudieran estar implicados varios genes. Por otro lado, existen muchas evidencias que las mutaciones individuales en un solo locus permiten la adaptación de las algas mesófilas a otros muchos contaminantes antropogénicos, incluidos los antibióticos (Sánchez-Fortún *et al.*, 2009a), herbicidas (Costas *et al.*, 2001; López-Rodas *et al.*, 2007; Marvá *et al.*, 2010), otros potentes biocidas (López-Rodas *et al.*, 2001; García-Villada *et al.*, 2002) y petróleo (Carrera-Martínez *et al.*, 2010; 2011). Incluso, las microalgas son capaces de adaptarse a metales pesados (Baos *et al.*, 2002; García-Villada *et al.*, 2004; Sánchez-Fortún *et al.*, 2009b). Esta capacidad es probablemente la responsable de que las microalgas tengan la habilidad de adaptarse a ambientes naturales extremos, como puede ser el río Tinto del sudoeste español, las aguas de la isla de Vulcano o las del río

Agrio argentino, entre otros (Flores-Moya *et al.*, 2005; Costas *et al.*, 2007; Costas *et al.*, 2008; López-Rodas *et al.*, 2008a, 2008b).

Adicionalmente, para comprobar que la resistencia se consigue gracias a raras mutaciones que aparecen de forma espontánea antes de la exposición al agente selectivo, se realizó un análisis de Newcombe con *D. chlorelloides* y 10 mg/L de TBT, y los resultados mostraron que las colonias resistentes aparecían con mayor frecuencia en las placas que se habían re-extendido, en lugar de en las placas que permanecieron intactas, apoyando la teoría de que los mutantes resistentes ya existían en el cultivo previamente al contacto con el TBT y que dichas mutaciones aparecen de forma aleatoria (Newcombe, 1949).

En última instancia, podría ser posible que la resistencia no se lograra si la presión de selección fuera tan extrema que ninguna mutación asegurara la adaptación. Este fue el caso de la más alta concentración ensayada con el lindano (120 mg/L), con la del TBT (10 mg/L) en *Prochloron* sp y la temperatura de 32,2 °C en *Symbiodinium* Cepa C1. En esta misma línea, Kwiatkowski y Roff (Kwiatkowski & Roff, 1976) ya reportaron diferentes tasas de extinción entre el fitoplancton al analizar un grupo de lagos oligotróficos acidificados en la orilla norte del lago *Huron*. Su trabajo puso de manifiesto que, por ejemplo, un lago no acidificado y con bajas concentraciones de metales pesados permitió la supervivencia de unas 55 especies de algas eucariotas, mientras que fueron solo 34 especies las que permanecieron en *Carlyle Lake*, que tenía un pH de, aproximadamente, 5 y niveles elevados de metales pesados. Adicionalmente, otro lago más gravemente afectado en la zona, con pH 4.6, sólo fue capaz de conservar 12 especies. Una situación parecida fue, también, demostrada por Stokes y colaboradores (Stokes *et al.*, 1973), quienes constataron que el *Baby Lake*, situado cerca de una fundición de níquel en Sudbury, estaba casi desprovisto de vida eucariota a excepción de una escasa población de *Chlorella*, atribuyendo dicha limitación a su pH de 4 y a sus muy altas concentraciones de metales pesados. Por lo tanto, parece acertado apuntar que los microorganismos puedan llegar a adaptarse, incluso cuando las condiciones lleguen a ser muy estresantes, pero cuando el estrés se vuelve crítico los microbios, en general, tienden a extinguirse y sólo los muy afortunados llegan a sobrevivir (Bell & Collins, 2008).

El procedimiento experimental del análisis de fluctuación empleado permitió, además, el cálculo de las tasas de mutación (μ) de genotipo sensible a genotipo resistente, con las diferentes sustancias empleadas. Para ello se utilizó la fórmula conocida como el estimador $p0$, llegándose a unos resultados que oscilaron entre $1,48 \cdot 10^{-5}$ a $9,9 \cdot 10^{-7}$. Comparando los resultados obtenidos en la presente tesis con los de otros trabajos en los que también se han realizado análisis de fluctuación, se puede afirmar que las tasas de mutación obtenidas se encuentran en el entorno de los mismos rangos que los de otras tasas de mutación que anteriormente han sido descritas, como los reportados por el grupo de investigación Albiotox en la resistencia a otros biocidas y compuestos tóxicos de varias especies de microalgas y cianobacterias (Costas *et al.*, 2001; López-Rodas *et al.*, 2001; Baos *et al.*, 2002; García-Villada *et al.*, 2002, 2004).

La adaptación a la contaminación se produce gracias a la aparición de los ya mencionados mutantes preselectivos; sin embargo, el mantenimiento de la mutación en las poblaciones se produce gracias al denominado equilibrio mutación-selección. Está ampliamente demostrado que la resistencia lleva implícito un coste asociado y que la mutación es, generalmente, deletérea, al menos en condiciones naturales (Keightley & Lynch, 2003). Las células resistentes tienen menor *fitness* o eficacia biológica, lo que puede traducirse en una menor capacidad fotosintética o en una menor tasa de crecimiento que el genotipo salvaje en ausencia del agente selectivo. Pudiéndose afirmar que el cambio ambiental tiende a desplazar el fenotipo promedio de las poblaciones bien adaptadas lejos de su óptimo por medio de la reducción de la *fitness* (Bell & Collins, 2008). Consecuentemente, debido al efecto de la selección natural que favorece el desarrollo de los más adaptados en ausencia de contaminación, estos mutantes resistentes serán tarde o temprano eliminados. Sin embargo, la aparición de la mutación que confiere resistencia es recurrente y estas raras variantes resistentes aparecen continuamente en las poblaciones, llegando, así, a un balance o equilibrio entre la aparición de mutantes resistentes y su eliminación por selección natural, condicionando la presencia de los resistentes en las poblaciones (Crown & Kimura 1970; Spiess, 1989). De acuerdo con estos planteamientos, en este trabajo se obtuvieron unas frecuencias de equilibrio oscilando de 42,2 mutantes resistentes por cada 10^4 genotipos a 2,66 mutantes resistentes por cada 10^6 genotipos sensibles, valores que deben ser suficientes para mantener la presencia de estos resistentes en poblaciones algales no expuestas a los contaminantes. Teniendo en cuenta el incontable número de

células que constituyen dichas poblaciones algales, el número de mutantes resistentes presentes podría ser suficiente para asegurar la supervivencia de las microalgas en un escenario de cambio global (Lynch *et al.*, 1991; Weber, 2004).

En el primer trabajo del capítulo II se comprobó cómo los resistentes obtenidos en el análisis de fluctuación pueden tener una utilidad importante en el campo de la biotecnológica y, en especial, en la biorremediación. Esta técnica se entiende como un proceso (ya sea de biodegradación, bioadsorción o bioacumulación) que emplea seres vivos (microorganismos, hongos, plantas, etc.), o las enzimas u otros derivados de ellos, para restablecer un ambiente alterado por la contaminación a su condición natural. Dicha técnica de eliminación de compuestos tóxicos o residuos peligrosos es, en general, eficiente y segura y puede ser aplicada con bajo coste en diversos ámbitos, ya sea para el tratamiento de suelos, aguas o lodos contaminados (Alexander, 1999; Juwarkar *et al.*, 2010). Además, hay que tener en cuenta que en los últimos años estos procesos han suscitado un gran interés por parte de la comunidad científica, lo que ha motivado que, también, haya ido creciendo gradualmente su aplicación a mayor o menor escala (Ayora *et al.*, 2001; Iwamoto & Nasu, 2001).

A lo largo de los últimos treinta años se ha seleccionado una amplia gama de microorganismos capaces de degradar los isómeros de lindano, principalmente los hongos (Arisoy & Kolankaya, 1997; Fragoeiro & Magan, 2005; Rigas *et al.*, 2007) y las bacterias (Gupta *et al.*, 2000; van Doesburg *et al.*, 2005; Chaudhary *et al.*, 2006). En cambio, sólo recientemente, ha suscitado un especial interés la cuestión de cómo participa el fitoplancton en el catabolismo de estos compuestos. Los organoclorados, entre los que se encuentra el lindano, se concentran en los ambientes acuáticos, ya sea porque acceden a través de las aguas residuales domésticas, por la infiltración de plaguicidas desde tierras agrícolas o por medio de efluentes industriales, entre otras causas. Debido a que el agua es el soporte fundamental para la vida del fitoplancton, una idea que puede ser de gran interés, y a la vez práctica, sería el poder utilizar los microorganismos fitoplanctónicos en la biorremediación de zonas contaminadas. Así, en los últimos años se han publicado algunos trabajos acerca de cómo las microalgas, en general, y las cianobacterias, en particular, son capaces de transformar estos compuestos tóxicos en compuestos menos nocivos e, incluso, inertes y no perjudiciales para el medio ambiente (El-Bestawy *et al.*, 2007; Ghasemi *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). En

este mismo sentido, como parte del trabajo experimental presentado en este documento de tesis, también se ha intentado contribuir al conocimiento de la posibilidad biorremediadora del lindano por parte del fitoplancton. Concretamente, se planteó la posibilidad de emplear células resistentes de *S. intermedius* en procesos de biorremediación frente al hexaclorociclohexano o lindano.

De este modo, se comprobó que dichos cultivos, obtenidos a partir del análisis de fluctuación, presentaron una extraordinaria capacidad para eliminar este organoclorado del medio, lo cual se dedujo de la pequeña cantidad de lindano detectada a la finalización de los experimentos de biorremediación correspondientes. Concretamente, los resultados revelaron una importante eficiencia de eliminación del contaminante situándose en valores del 98,65 %, 98,80 % y 75,26 % con las tres dosis diferentes ensayadas, 5, 15, 40 mg/L, respectivamente. Al contrastar estos datos con los resultados obtenidos de los controles abióticos pudo confirmarse el papel esencial y determinante de estas microalgas en la eliminación de lindano. Estos resultados son muy alentadores si se tiene en cuenta que en la bibliografía aunque se encuentran diversos estudios que utilizan en este caso cianobacterias en la bioremediación de efluentes contaminados con lindano, lo cierto es que, sin embargo, al no utilizar células resistentes sino simplemente tolerantes, las dosis que las células son capaces de biorremediar y los porcentajes de eficiencia son mucho menores. Así en el estudio realizado por Zhang y colaboradores en el 2012 (Zang *et al.*, 2012) la cianobacteria *Anabaena azotica* solo conseguía eliminar el lindano de una concentración inicial de 0,2 mg/L al 48,8% datos que no son comparables al 90 % de media que se consigue empleando mutantes resistentes.

Junto con los problemas mencionados derivados del vertido de contaminantes a los ecosistemas, la diversidad biológica también se ha de enfrentar, en un futuro próximo, a nuevos retos relacionados con el cambio global. Pero lo cierto es que muchas comunidades ya están encontrándose gravemente amenazadas por diversas presiones antropógenicas y por el propio desarrollo de la civilización, desembocando, todo ello, en la destrucción del hábitat o en su modificación (Mergeay & Santamaria, 2012). En este sentido, las especies invasoras introducidas en un ecosistema pueden provocar graves alteraciones en el mismo (Occhipinti-Ambrogi & Savini, 2003; Fahnenstiel *et al.*, 2009; Díez *et al.*, 2012); en particular, en este estudio, se investigó la posibilidad de que se introdujeran especies exóticas, adheridas al *biofouling* de los

barcos, en ecosistemas costeros. Así, se encontró que numerosas especies de microalgas eran componentes habituales de la capa de bioensuciamiento del casco de los barcos, como por ejemplo cianobacterias, diatomeas pennadas, dinoflagelados bénticos, además de diversas especies de los géneros *chlorophycophyta* y *haptophyta*. Es especialmente preocupante el transporte a largas distancias de microalgas productoras de toxinas; en este sentido, durante los años 50 Margalef analizó las especies de microalgas de la Ría de Vigo en la costa gallega, proporcionando una lista muy extensa de especies de fitoplancton (Margalef *et al.*, 1955; Margalef, 1956). Sin embargo, Margalef nunca evidenció la presencia de especies implicadas en el desarrollo de *blooms* de algas tóxicas, no obstante, hoy en día dicha zona, que es una de las áreas más importantes de acuicultura de mariscos de la Unión Europea, se encuentra permanentemente en alerta debido a la posibilidad de que se den estas floraciones muy perjudiciales para la salud y con graves impactos en su economía (Bravo *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2011).

Actualmente existen numerosos estudios de investigación enfocados en el estudio de los efectos del cambio global brusco en los ecosistemas acuáticos, siendo su objetivo fundamental visionar, en la medida de lo posible, el futuro para poder encontrar posibles soluciones y analizar las estrategias de adaptación a los cambios (Bells & Collins 2008; Litchman *et al.*, 2012; Reusch & Boyd, 2013). Sin embargo, existen pocos estudios dirigidos hacia el estudio de un cambio global gradual y a la determinación de la máxima capacidad de adaptación de los organismos frente a las presiones selectivas a que están sometidos. Además, teniendo en cuenta que es desconocido el límite de perturbación que los ecosistemas pueden soportar antes de que en ellos se extinga la vida, es interesante conocer cómo responden sus poblaciones de microorganismos y, especialmente, los organismos fitoplanctónicos, ante un aumento progresivo de la contaminación que pudiera llegar hasta al límite de sus capacidades adaptativas. Se ha constatado que en el caso de un cambio ambiental repentino, la *fitness* de una población disminuye rápidamente y, poco después de la caída inicial, se recupera por mutaciones de gran efecto que se fijan rápidamente (Collins & De Meaux, 2009), circunstancia que, como se indicó anteriormente, se ha comprobado en este trabajo con en el análisis de fluctuación. Por otro lado, se sabe que si el entorno cambia gradualmente, la *fitness* disminuye progresivamente y ésta a su vez, se va recuperando a través de mutaciones de pequeño efecto que se fijan lentamente. Es decir, las mutaciones con un efecto pequeño pueden no ser capaces de fijarse lo suficientemente

rápido como para mantener la población efectiva en un ambiente degradado y, por tanto, la *fitness* puede disminuir gradualmente antes de ser recuperada mediante alguna mutación beneficiosa, lo que desembocaría en una sucesión periódica de mutaciones favorables (Collins *et al.* 2007; Bell & Collins, 2008; Lindsey *et al.*, 2013).

Ya han sido reportados modelos teóricos y experimentales que estudian el efecto del cambio global gradual en los diferentes patrones de adaptación (Collins *et al.*, 2007). Sin embargo, con el protocolo experimental de *ratchet* presentado en esta tesis, se aporta una nueva visión a los experimentos de evolución, ya que, gracias a la combinación del mantenimiento de una elevada población experimental y diferentes presiones de selección, se maximiza, simultáneamente, la selección natural y la aparición de nuevas mutaciones en las poblaciones. Además, si se añade la posibilidad de realizar el protocolo con diferentes cepas y especies se puede demostrar la adaptación diferencial de los organismos. Trabajos recientes, utilizando el mismo procedimiento, han demostrado que el cambio global está produciendo una importante reorganización en las poblaciones de organismos fitoplanctónicos predominantes, demostrando que el grupo taxonómico, el nivel de ploidía, la tasa de crecimiento y la preferencia de hábitat están implicados en la capacidad de los diferentes grupos de fitoplancton para adaptarse a un contaminante (Huertas *et al.*, 2010, 2011).

Con el trabajo presentado en esta tesis, se investigó la posibilidad de conocer la máxima capacidad de adaptación de seis cepas de organismos fitoplanctónicos, tres cepas de cianobacterias y tres de clorofitas, frente a la presencia de sulfato de cobre (compuesto frecuentemente utilizado para controlar los *blooms* o floraciones de cianobacterias en embalses de abastecimiento). Para ello se utilizó un protocolo experimental denominado “trinquete” o *ratchet*. No obstante, antes del inicio del experimento de *ratchet*, se determinaron las dosis inhibitorias de sulfato de cobre para las seis cepas ancestrales de tipo salvaje, encontrándose que la dosis necesaria para inhibir el 100 % del crecimiento era un 80 % menor en las cianobacterias que en las clorofitas. Posteriormente, con la realización del protocolo de *ratchet*, es decir cuando se comparó su potencial de adaptación frente al aumento de las dosis de sulfato de cobre utilizadas, se observaron, también, notables diferencias entre las diferentes especies de fitoplancton ensayadas. Los resultados revelaron que mientras que la resistencia al sulfato de cobre de especies clorofitas aumentó casi 22 veces respecto a la dosis

inhibitoria, determinada con anterioridad a la realización de los experimentos de *ratchet*, la resistencia de la cianobacteria *M. aeruginosa* aumentó sólo entre 4 y 12 veces.

La dinámica de los experimentos de *ratchet* también permite investigar si la adaptación se produjo por mecanismos genéticos o por una aclimatación fisiológica, dado que cada réplica se desarrolla como una población independiente, fundada a partir de una única célula. En general, los resultados obtenidos con las tres repeticiones de la misma cepa, contempladas en el protocolo experimental, mostraron diferentes patrones de crecimiento durante el experimento; además, la variación entre replicas se observó especialmente cuando se alcanzaron las dosis superiores. Con la totalidad de las réplicas estudiadas, se confirmó que la adaptación a las dosis más elevadas se produjo gracias a la concurrencia de mecanismos genéticos; lo que fue debido a que eran diferentes tanto el tiempo como el número de generaciones requeridas para la adaptación de las réplicas experimentales de la misma especie y sometidas a una misma dosis. En realidad este hecho no hace más que confirmar la adaptación genética, ya que, previamente se había demostrado que los mecanismos implicados en la aparición de resistencia en la cianobacteria *M. aeruginosa*, cuando se exponía a dosis letales de cobre, surgían por mutaciones espontáneas que se producían al azar, antes de la exposición al tóxico (García-Villada *et al.*, 2004).

Por último, hay que recalcar que la tasa de crecimiento de las poblaciones derivadas después de los experimentos de *ratchet* fue significativamente menor que la tasa de crecimiento en las poblaciones de genotipo salvaje antes de la realización del experimento de *ratchet*, confirmando nuevamente el hecho de que los mutantes resistentes tienen menos *fitness* o eficacia biológica que el genotipo salvaje (Lenski, 1998). Sin embargo, un estudio reciente realizado con *Chlamydomonas reinhardtii* ha demostrado que el coste de la adaptación es considerablemente menor si los cambios ambientales son graduales (Collins & Meaux, 2009); sugiriendo que este hecho está relacionado con que las mutaciones con escaso efecto en el fenotipo tienen, a su vez, también menos efecto pleiotrópico (Cooper *et al.*, 2007) y con que la acumulación de mutaciones beneficiosas dan como resultado un fenotipo más sólido y más adaptado al entorno (Lande, 2007). Esta discrepancia, puede ser justificada basándose en el número de generaciones ya que en el experimento de *Chlamydomonas* las células se propagaron

durante 240 generaciones, dando más tiempo a la adaptación, y en la presente experimentación el número máximo de generaciones fueron 90.

Profundizando en el concepto de la adaptación diferencial entre especies, estudios previos (Huertas *et al.*, 2010) demostraron que la máxima adaptación en las especies de fitoplancton a otros compuestos, tales como el herbicida simazina difiere según el grupo taxonómico, el nivel de ploidía de las células vegetativas (haploides vs diploides), la tasa de crecimiento, y el origen del hábitat. Cabe destacar que las tres especies estudiadas en el presente estudio, se aislaron de aguas no contaminadas y, además, se trata también de organismos haploides; así, las diferentes capacidades de adaptación pueden ser explicadas simplemente por considerar las diferencias en el grupo taxonómico y en las tasas de crecimiento. Se sabe que los organismos con mayores tasas de crecimiento son capaces de una adaptación más rápida debido a que se producen más generaciones en el mismo intervalo de tiempo, por lo que sus poblaciones pueden acumular mayor número de mutaciones beneficiosas (Fu *et al.*, 2011). En definitiva, de los resultados presentados en esta memoria, podría concluirse el hecho de que la cianobacteria *M. aeruginosa*, al haber mostrado las menores tasas de crecimiento en comparación con las algas eucariotas, podría estar relacionada con una menor capacidad de adaptación.

Por otra parte, diferentes estudios (Takamura *et al.*, 1989; Hadjoudja *et al.*, 2009) han demostrado que las cianobacterias se ven más afectadas por ciertos tóxicos que las especies eucariotas. La explicación más probable a este hecho es que éste se pueda atribuir a una organización más simple a nivel celular de las cianobacterias en comparación con las microalgas eucariotas (Graham & Wilcox, 2000). Por ejemplo, se ha indicado que en procariotas la desintoxicación de metales pesados se apoya, fundamentalmente, en el eflujo citoplásmico (Silver, 1996). Aunque este mecanismo también está presente en las algas y en las plantas, el principal instrumento de tolerancia a metales pesados se basa en el almacenamiento de éstos en las vacuolas citoplásmicas (Hall, 2002). Además, la comparación de las secuencias del genoma de varias algas con el de las plantas superiores mostró que las algas unicelulares poseen las herramientas básicas, como se describe en las plantas superiores, para mantener la homeostasis celular del metal (Kramer *et al.*, 2007). En cuanto a la tolerancia al tóxico empleado en esta tesis, el sulfato de cobre, tanto en estudios de laboratorio (Soldo & Behra, 2000;

Ianacone & Touchette, 2008) como en estudios *in situ* (Le-Jeune *et al.*, 2006; Atazadeh *et al.*, 2009) se han examinado los cambios en la estructura, la clase y el tamaño de las comunidades de fitoplancton tras sucesivas adiciones de sulfato de cobre. Coincidiendo todos estos estudios en que se está produciendo un cambio de composición taxonómica sucediéndose el dominio de la comunidad de cianobacterias a la mayoría de especies de clorofitas. Por último, también se confirmó que el grado de sensibilidad al sulfato de cobre fue menor en las cianobacterias que en las algas eucariotas (Takamura *et al.*, 1990; Hadjoudja *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de que las cianobacterias estaban más seriamente afectadas, se observó crecimiento de algunas de ellas también después de unos días de exposición, probablemente, como consecuencia del crecimiento de variantes resistentes, lo que podría acarrear consecuencias en el manejo de los *blooms* (Atazadeh *et al.*, 2009).

En el segundo experimento de *ratchet* realizado en esta tesis, se estudió el límite adaptativo del *Symbiodinium* Cepa C1 a la subida de temperatura y se investigó la posibilidad de encontrar un mutante resistente a la misma, debido a que la termotolerancia de los corales está fuertemente influenciada por la sensibilidad o la resistencia de los endosimbiontes dinoflagelados del género *Symbiodinium* (Howells *et al.*, 2011). Las zooxantelas se reproducen asexualmente *in hospite* (en el hospedador), mientras que se puede dar la reproducción sexual fuera de éste (Santos *et al.*, 2003; Correa & Baker, 2009). Las mutaciones que ocurren *in hospite* y derivan en un cambio fenotípico, son susceptibles de ser seleccionadas y, si la mutación es beneficiosa, el nuevo mutante (por ejemplo más termo-resistente) puede desplazar los genotipos originales de la colonia coralina y, por lo tanto, hacer más resistentes a los corales a la subida de la temperatura.

Son mucho los autores que han aportado hipótesis de cómo podrían cambiar las grandes barreras coralinas con el progresivo calentamiento del planeta debido a su extrema sensibilidad a los cambios ambientales (Berkelmans & van Oppen 2006; Jones *et al.*, 2008). Recientemente se ha planteado la idea de que las mutaciones espontáneas en los microorganismos del tipo *Symbiodinium*, proporcionándoles resistencia a la temperatura, podrían ser el *fuel* que necesitan los corales en este proceso de adaptación (van Oppen *et al.*, 2011). Sin embargo, los resultados encontrados en esta tesis, basados en el *ratchet* y apoyados mediante la realización de un análisis de fluctuación revelan

que parece imposible encontrar una variante genética resistente a la temperatura letal de 32,2 °C en *Symbiodinium* Cepa C1, ya que a dicha temperatura se produce un daño irreversible en las antenas fotosintéticas del fotosistema II (PSII) (Takahashi *et al.*, 2013). Adicionalmente, se plantea que el mecanismo que gobierna en la tolerancia a elevadas temperaturas es la aclimatación o adaptación fisiológica (Jones *et al.*, 2008; Bellantuono *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2013). En este sentido, en el presente estudio todas las réplicas se aclimataban a la temperatura de 31,5 °C, ya que todas presentaban unos patrones de crecimientos y unas eficiencias fotosintéticas muy similares, dependiendo dicho proceso de aclimatación de una variación en la composición de los ácidos grasos de la membrana plasmática de los tilacoides (Díaz-Almeyda *et al.*, 2011). Adicionalmente, en este caso de aclimatación se ha evidenciado un raro ejemplo en el que el límite térmico vital casi se superpone con un límite térmico para el crecimiento y la reproducción. Lo habitual es que haya una cierta diferencia entre estos límites, que en el caso de organismos estenotermos es de 4-5 °C y en los organismos euritermos la diferencia llega a ser de 10-15 °C. Sin embargo, en este caso se ha encontrado una ventana de menos de 3 °C entre los límites térmicos.

A pesar de esta evidencia, todavía existe la esperanza de que la gran variabilidad genética que existe a lo largo del arrecife permita obtener respuestas diferentes al mismo problema de estrés (Almany *et al.*, 2009). Sin embargo, muchos especialistas son conscientes de que la adaptación lleva tiempo y los cambios están ocurriendo demasiado rápido, por lo que pudiera llegar un punto de no retorno en el que la comunidad no fuera capaz de recuperarse y volver a la madurez y complejidad anteriores. Así pues, lo que se está observando hoy en día es una transformación del arrecife coralino con grandes extensiones de coral muertas donde las especies dominantes son las algas macroscópicas (Rossi, 2011).

Para concluir, puede apuntarse que la evolución de las poblaciones de fitoplancton en este escenario de cambio global sigue siendo impredecible y poco clara, necesiándose, por tanto, realizar por parte de la comunidad científica un amplio y minucioso trabajo para lograr dichos objetivos. Sin embargo, aunque esta técnica suponga una simplificación de la realidad permite prever, de una forma novedosa, el límite adaptativo y la adaptación diferencial en grupos clave de organismos fitoplanctónicos. Los datos han mostrado que, efectivamente, existirá una amplia

variedad de respuesta inter-específica basándose en la variabilidad genética de los individuos y en la diferente capacidad de fijación de las mutaciones beneficiosas que permitan dicha adaptación. Ésta capacidad, sin duda, provocará cambios en la composición de la comunidad del fitoplancton, así como la sustitución de unos individuos por otros más resistentes (Litchman *et al.*, 2012).



8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos con el presente trabajo se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Puede concluirse una elevada influencia de la contingencia histórica y de la adaptación genética en el aumento de la tasa de crecimiento de *A. minutum* en las nuevas condiciones ambientales ensayadas, lo que puede sugerir que en un futuro próximo podría aumentar la aparición de mareas rojas. Sin embargo, la producción de toxina está mayormente controlada por el azar, por lo que la toxicidad será impredecible.
- 2) En todos los experimentos analizados los mutantes aparecen de forma espontánea por azar y a muy baja frecuencia (de 10^{-4} a 10^{-7}) sin que los agentes selectivos ensayados (metales pesados, lindano o aumento de la temperatura) induzcan o favorezcan su aparición.
- 3) Todos los mutantes resistentes tienen una menor eficacia biológica y una menor eficiencia fotosintética, manteniéndose en las poblaciones en un equilibrio mutación-selección.
- 4) Independientemente de la presión de selección realizada algunos organismos fitoplanctónicos no consiguen adaptarse a las nuevas condiciones y mueren.
- 5) Los organismos resistentes por mutación genética podrían servir como agentes biorremediadores, como es el caso de *S. intermedius* que es capaz de biodegradar el lindano.
- 6) Las clorofitas *D. chlorelloides* y *S. intermedius* fueron capaces de crecer a 270 μm de sulfato de cobre, aumentando 22 veces su capacidad de adaptación inicial tras el experimento de *ratchet*. Por el contrario, la cianobacteria *M. aeruginosa* solo consiguió crecer a un máximo de 30 μm aumentando en 12 veces su capacidad de crecimiento.

- 7) El límite adaptativo de la cepa de *Symbiodinium* estudiada es hasta el momento de 32,2°C ya que no se ha podido encontrar ningún mutante resistente a esta temperatura.



9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abrego D, Ulstrup KE, Willis BL, van Oppen MJH (2008) Species-specific interactions between algal endosymbionts and coral hosts define their bleaching response to heat and light stress. *Proceedings of the Royal Society B*, 275: 2273-2282.
- Ackerly DD (2003) Community assembly, niche conservatism, and adaptive evolution in changing environments. *International Journal of Plant Sciences*, 164: 165–184.
- Alexander M (1999) Biodegradation and Bioremediation, second ed. Academic Press, San Diego.
- Almany GR, Connolly SR, Heath DD, Hogan JD, Jones GP, McCook LJ, Mills M, Pressey RL & Williamson DH (2009) Connectivity, biodiversity conservation and the design of marine reserve networks for coral reefs. *Coral Reefs*, 28: 339-351.
- Alvarez LW, Alvarez W, Asaro F & Michel HV (1980) Extraterrestrial cause for the Cretaceous – Tertiary extinction. *Science*, 208: 1095 – 1098.
- Alvarez W, Asaro F & Montanari A (1990) Iridium profile for 10 million years across the Cretaceous–Tertiary boundary at Gubbio (Italy). *Science*, 250: 1700–1702.
- Al Yaqout AF (2003) Assessment and analysis of industrial liquid waste and sludge disposal at unlined landfill sites in arid climate. *Waste Management*, 23: 817–824.
- Anderson DM (1989) Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. In: Red tides: Biology, environmental science, and toxicology. Okaichi T, Anderson DM, & Nemoto T (eds.), pp. 11-16. Elsevier, New York, NY, USA.
- Arisoy M & Kolankaya, N (1997) Biodegradation of lindane by *Pleurotus sajor-caju* and toxic effects of lindane and its metabolites on mice. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59: 352–359.
- Arrhenius A, Backhaus T, Gronvall F, Junghans M, Scholze M & Blanck H (2006) Effects of three antifouling agents on algal communities and algal reproduction: Mixture toxicity studies with TBT, Irgarol, and Sea-Nine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50: 335-345.
- Atazadeh I, Kelly M, Sharifi M & Beardall J (2009) The effects of copper and zinc on biomass and taxonomic composition of algal periphyton communities from the

- River Gharasou, Western Iran. *International Journal of Oceanography and Hydrobiology*, 38: 3-14.
- Ayora C, Baretino D, Doménech C, Fernández M, López-Pamo E, Olivella S, de Pablo J & Saaltink M (2001). Meteorización de los lodos piríticos de Aznalcóllar. *Boletín Geológico y Minero*, 112: 137-162.
- Azevedo, SMFO, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR & Eaglesham GK (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*, 181-182: 441-446.
- Bangkedphol S, Keenan HE, Davidson C, Sakultantimetha A & Songsasen A (2009) The partition behavior of tributyltin and prediction of environmental fate, persistence and toxicity in aquatic environments. *Chemosphere*, 77: 1326-1332.
- Baos R, García-Villada L, Agrelo M, López Rodas V, Hiraldo F & Costas E (2002) Short-Term adaptation of microalgae in highly stressfull environments: an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *European Journal of Phycology*, 37: 593-600.
- Baptiste E & Walsh DA (2005) Does the 'Ring of Life' ring true? *Trends in Microbiology*, 13: 256–61.
- Bartlett MS (1937) Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Statistical Society Series A*, 160: 268–282.
- Belfiore, NM & Anderson SL (2001) Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research*, 489: 97–122.
- Bell G (2013) Evolutionary rescue and the limits of adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, B 368: 20120080.
- Bell G & Collins S (2008) Adaptation, extinction and global change. *Evolutionary Applications*, 382: 3-16.
- Bellantuono AJ, Hoegh-Guldberg O & Rodriguez-Lanetty M (2012) Resistance to thermal stress in corals without changes in symbiont composition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279: 1100-1107.
- Berkelmans R & van Oppen MJH (2006) The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: A 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. *Proceedings of the Royal Society B*, 273: 2305–2312.
- Bhattacharya P, Sracek O, Eldvall B, Asklund R, Barmen G, Jacks G, Koku J, Gustafsson JE, Singh N & Balfors BB (2012) Hydrogeochemical study on the

- contamination of water resources in a part of Tarkwa mining area, Western Ghana. *Journal of African Earth Sciences*, 66-67: 72-84.
- Biermann F, Betsill MM, Vieira SC, Gupta J, Kanie N, Lebel, L *et al.* (2010). Navigating the anthropocene: the Earth System Governance Project strategy paper. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2: 202-208.
- Bossuyt BTA & Janssen CR (2004) Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. *Aquatic Toxicology*, 68: 61-74.
- Bradshaw AD & Hardwick K (1989) Evolution and stress—genotype and phenotype components. *Biological Journal of Linnean Society*, 37: 137–155.
- Bravo I, Fraga S, Figueroa RI, Pazos Y, Massanet A & Ramilo I (2010). Bloom dynamics and life cycle strategies of two toxic dinoflagellates in a coastal upwelling system (NW Iberian Peninsula). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57: 222-234.
- Breitburg D (2002) Effects of hypoxia, and the balance between hypoxia and enrichment, on coastal fishes and fisheries. *Estuaries*, 25: 767–81.
- British Standards Institute, 1979. Precision of tests methods I. Guide for the determination of repeatability and reproducibility for a standard test method for inter-laboratory tests. BS 5497. Part I. British Standards Institute, London.
- Bruno JF & Selig ER (2007) Regional Decline of Coral Cover in the Indo-Pacific: Timing, Extent, and Subregional Comparisons. *PLoS ONE* 2: e711.
- Burriel F, Lucen F & Arribas S (1975) Química analítica cualitativa. Ed. Paraninfo, Madrid. ISBN: 84-238-0287-1.
- Cairns J, Overbaugh J & Miller S (1988) The origin of mutants. *Nature*, 335: 142-145
- Caldeira K & Wickett ME (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. *Science*, 425: 365-365.
- Caldeira K & Wickett ME (2005) Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysical Research*, 110: C09S04, doi:10.1029/2004JC002671.
- Calvo-Vargas & Arguedas M (2012): Muestreo de las Floraciones Algaes Nocivas (FANs) en el Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica. Universidad Nacional: Heredia-Costa Rica. Recuperado de:
http://www.una.ac.cr/observatorio_ambiental/index.php?option=com_booklibrary&task=view&%20id=29&catid=45&Itemid=37

- Camargo JA & Alonso, Á (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International*, 32: 831-849.
- Campbell NA (1990) Biology 2nd edition. Redwood City (CA): The Benjamin/Cummings Publishing Company. ISBN: 0-8053-1880-1.
- Cao S, Wang J, Chen H & Chen D (2011) Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin*, 56: 598-612.
- Capdevila-Argüelles L, Zilletti B & Suárez Álvarez VA (2011) Cambio climático y especies exóticas invasoras en España. Diagnóstico preliminar y bases de conocimiento sobre impacto y vulnerabilidad. Documento de síntesis. Oficina Española de Cambio Climático, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid.
- Capó Martí MA (2007) Principios de ecotoxicología. Editorial Tébar S.L. Madrid. ISBN: 978-84-7360-263-1.
- Carmichael WW (1994) The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, 270: 78–86.
- Carmichael WW, Azevedo SM, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S et al. (2001) Human fatalities from Cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 109: 663-668.
- Carmichael WW & Hui R (2006) Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. *Saline Systems*, 2: 5.
- Carpenter EJ & Carmichael WW (1995) Taxonomy of cyanobacteria. In: Hallegraeff GM, Anderson DM & Cembella AD (Eds). Manual on harmful marine microalgae. IOC Manual and Guides No. 33. Paris, UNESCO. 373-380.
- Carrera-Martínez D, Mateos-Sanz A, López-Rodas V & Costas E (2010) Microalgae response to petroleum spill: An experimental model analysing physiological and genetic response of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige. *Aquatic Toxicology*, 97: 151-159.
- Carrera-Martínez D, Mateos-Sanz A, López-Rodas V & Costas E (2011) Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. *Aquatic Toxicology*, 101: 342–350.
- Charmantier A, McCleery RH, Cole LR, Perrins C, Kruuk LEB & Sheldon BC (2008) Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. *Science*, 320: 800–803.

- Chaudhary P, Kumar M, Khangarot BS & Kumar A (2006) Degradation and detoxification of hexachlorocyclohexane isomers by *Pseudomonas aeruginosa* ITRC-5. *International Biodegradation & Biodeterioration*, 57: 107–113.
- Chen J, Zhang DW, Xie P, Wang Q & Ma ZM (2009a) Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Science of the Total Environment*, 407: 3317–3322.
- Chen J, Xie P, Li L & Xu J (2009b) First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicological Sciences*, 108: 81–89.
- Chevin L-M, Lande R, Mace GM (2010) Adaptation, Plasticity, and Extinction in a Changing Environment: Towards a Predictive Theory. *PLoS Biol* 8: e1000357.
- Cifuentes JL, Torres-García P & Frías M (1997) El océano y sus recursos. Ed Fondo de Cultura Económica, México, D.F. ISBN 968-16-5247-9.
- Colegrave N & Buckling A (2005) Microbial experiments on adaptive landscapes. *BioEssays*, 27, 1167-1173.
- Collins S, De Meaux J & Acquisti C (2007) Adaptive walks toward a moving optimum. *Genetics*, 176: 1089-1099.
- Collins S & De Meaux J (2009) Adaptation to different rates of environmental change in *Chlamydomonas*. *Evolution*, 63: 2952–2965.
- Concas A, Ardañ C, Cristini A, Zuddas P & Cao G (2006) Mobility of heavy metals from tailings to stream waters in a mining activity contaminated site. *Chemosphere*, 63 244–253.
- Conferencia internacional sobre Biodiversidad: Ciencia y Gobernanza. January, 24 to 28. UNESCO, Paris, France.
- Cooper TF, Ostrowski EA & Travisano M (2007) A negative relationship between mutation pleiotropy and fitness effect in yeast. *Evolution*, 61: 1495-1499.
- Correa AMS & Baker AC (2009) Understanding diversity in coral-algal symbiosis: a cluster-based approach to interpreting fine-scale genetic variation in the genus *Symbiodinium*. *Coral Reefs*, 28: 81-93.
- Costas E, Carrillo E, Ferrero LM, Agrelo M, García-Villada L, Juste J & López-Rodas V (2001) Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides*

- (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea herbicide. *Phycologia*, 40: 391-398.
- Costas E, Flores-Moya A, Perdigonés N, Maneiro E, Blanco JL, García ME & López Rodas V (2007) How eukaryotic algae can adapt to the Spain's Rio Tinto: A neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *New Phytologist*, 175: 334-339.
- Costas E, Flores-Moya A & López-Rodas V (2008) Rapid adaptation of algae to extreme environments (geothermal waters) by single mutation allows "Noah's Arks" for photosynthesizers during the Neoproterozoic "snowball Earth"? *New Phytologist*, 180: 922-932.
- Costas E & López Rodas V (2011) El papel del fitoplancton en el cambio climático: ¿cuánto depende nuestro destino de unas pequeñas microalgas? *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 77: 52-74.
- Cowen LE, Kohn LM & Anderson JB (2001) Divergence in fitness and evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 183: 2971-2978.
- Crow JF & Kimura M (1970) An Introduction to Population Genetics Theory. In: Harper and Row (ed) New York, 591 p.
- Crutzen PJ & Stoermer EF (2000). The Anthropocene. *Global Change Newsletter*, 41: 17-18.
- Cuevas JM, Elena SF & Moya A (2002) Molecular basis of adaptive convergence in experimental populations of RNA viruses. *Genetics*, 162, 533-542.
- Dajoz R (2002) Tratado de ecología. Ediciones Mundi-Prensa Madrid. ISBN: 8471148285.
- Darwin C (1859) On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. John Murray (ed) (1ª edición), Londres.
- Davidson K, Gowen RJ, Tett P, Bresnan E, Harrison PJ, McKinney A, Milligan S, Mills DK, Silke J & Crooks AM (2012) Harmful algal blooms: How strong is the evidence that nutrient ratios and forms influence their occurrence? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115: 399-413.
- De Senenport Domis LN, Mooij WM & Huisman J (2007) Climate induced shifts in a phytoplankton community: a mechanistic approach. *Hydrobiologia*, 584: 403-413.

- Díaz-Almeyda E, Thomé PE, El Hafidi M & Iglesias-Prieto R (2011) Differential stability of photosynthetic membranes and fatty acid composition at elevated temperature in *Symbiodinium*. *Coral Reefs*, 30: 217-225.
- Diaz RJ & Rosenberg R (1995) Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology Ann Rev*, 33: 245–303.
- Diez JM, D'Antonio CM, Dukes JS, Grosholz ED, Olden JD, Sorte CJB, Bradley BA, Early R, Ibanez I, Jones SJ, Lawler JJ & Miller LP (2012) Will extreme climatic events facilitate biological invasions? *Frontier Ecology Environment*, 10: 249-257.
- Dobzhansky T, Ayala FJ, Stebbins GL & Valentine JW (1980) Evolución. Ed. Omega, S.A. Barcelona. ISBN: 84-282-0568-X.
- Doney SC & Schimel DS (2007) Carbon and climate system coupling on timescales from the Precambrian to the Anthropocene. *Annual Reviews Environmental Resources*, 32: 31–66.
- Doren RF, Richards JH & Volin JC (2009) A conceptual ecological model to facilitate understanding the role of invasive species in large-scale ecosystem restoration. *Ecological Indicators*, 9: 150 – 160.
- Drake JM & Lodge DM (2007) Hull fouling is a risk factor for intercontinental species exchange in aquatic ecosystems. *Aquatic Invasions*, 2: 121-131.
- El-Bestawy EA, Abd El-Salam AZ & Mansy AEH (2007) Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59: 180–192.
- Eldredge N (2001) The sixth extinction. American Institute of Biological Sciences, Washington, DC Available from <http://www.actionbioscience.org/newfrontiers/eldredge2.html>.
- Elena SF & Lenski RE (2003) Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Genetics*, 4: 457-469.
- Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA & Orr JC (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES. Journal of Marine Science*, 65:414–32.
- Fahnenstiel G, Hong Y, Millie D, Doblin M, Johengen T & Reid D (2009) Marine dinoflagellate cysts in the ballast tank sediments of ships entering the Laurentian Great Lakes. *Verh Internat. Verein Limnol*, 30: 1035-1038.

- Falkowski PG, Fenchel T & Delong EF (2008) The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320: 1034–1039.
- Feely RA, Sabine CL, Lee K, Berelson W, Kleypas J, Fabry VJ & Millero FJ (2004) Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science*, 305: 362–366.
- Fleeger JW, Carman KR & Nisbet RM (2003) Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment*, 317: 207–233.
- Flores-Moya A, Costas E, Bañares-España E, García-Villada L, Altamirano M. & López-Rodas V (2005) Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through pre-selective mutations. *New Phytologist*, 166: 655–661.
- Flores-Moya A, Costas E & López-Rodas V (2008) Roles of adaptation, chance and history in the evolution of the dinoflagellate *Prorocentrum triestinum*. *Naturwissenschaften*, 95, 697–703.
- Forest A, Tremblay JE, Gratton Y, Martin J, Gagnon J *et al.*, (2011) Biogenic carbon flows through the planktonic food web of the Amundsen Gulf (Arctic Ocean): A synthesis of field measurements and inverse modeling analyses. *Progress in Oceanography*, 91: 410–436.
- Foster PL (2000) Adaptive mutation: implications for evolution. *BioEssays*, 22: 1067–1074.
- Fragoeiro S & Magan N (2005) Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environmental Microbiology*. 7: 348–355.
- Fu Y, Huang R, Zheng Y, Zhang Z, Liang A (2011) Glioma-derived mutations in isocitrate dehydrogenase 2 beneficial to traditional chemotherapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410:218–223.
- Galloway JN & Cowling EB (2002) Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *Ambio*, 31: 64–71.
- García-Villada L, López-Rodas V, Bañares E, Flores-Moya A & Costas E (2002) Evolution of microalgae in highly stressing environments: an experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by rare preselective mutation. *Journal of Phycology*, 38: 1074–1081.
-

- García-Villada L, Rico M, Altamirano M, Sánchez L, López-Rodas V & Costas E (2004) Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulphate as algaecide. *Water Research*, 38: 2207-2213.
- Gardner TA, Cote IM, Gill JA, Gant A & Watkinson AR (2003) Long-term region-wide declines in Caribbean corals. *Science*, 301: 958-960.
- Garland T & Rose MR (2009) Experimental evolution: concepts, methods, and applications of selection experiments. Garland T & Robertson JM (eds) Univ of California Press. ISBN 978-0-520-24766-6.
- Geist J (2011) Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. *Ecological Indicators*, 11: 1507–1516.
- Ghasemi Y, Rasoul-Amini S & Fotooh-Abadi E (2011) The biotransformation, biodegradation, and bioremediation of organic compounds by microalgae. *Journal of Phycology*, 47: 969–980.
- Gipperth L (2009) The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: Direct and indirect effects. *Journal of Environmental Management*, 90: 586-595.
- González R, García-Balboa C, Rouco M, Lopez-Rodas V & Costas E (2012). Adaptation of microalgae to lindane: A new approach for bioremediation. *Aquatic Toxicology*, 109: 25-32.
- Gould SJ & Lewontin RC (1979) The Spandrels of San Marco and the Panglossian Paradigm: A Critique of the Adaptationist Programme. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 205: 581-598.
- Gould SJ (1989) *Wonderful life: The Burgess Shale and the nature of history*. Norton, New York. ISBN 978-84-7423-493-0.
- Graham LE & Wilcox LW (2000) *Algae*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA, 640 pp. ISBN 0-13-6603335.
- Graneli E & Flynn K (2006) Chemical and physical factors influencing toxin content. In: Graneli E, Turner JT (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*, Ecological Studies, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp. 189–201.
- Guisande C, Frangópulos M, Maneiro I, Vergara AR & Riveiro I (2002) Ecological advantages of toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* under phosphorus limitation. *Marine Ecology Progress Series*, 225: 169-176.

- Gupta A, Kaushik CP & Kaushik A (2000) Degradation of hexachlorocyclohexane (HCH; a, b, g and d) by *Bacillus circulans* and *Bacillus brevis* isolated from soil contaminated with HCH. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 1803–1805.
- Hadjoudja S, Vignoles C, Deluchat V, Lenaina JF, Le Jeunea AH & Baudu M (2009) Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. *Aquatic Toxicology*, 94: 255-264.
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1-11.
- Hall BK & Hallgrímsson B (2008) Strickberger's Evolution. ed: Jones & Bartlett learning. pp. 762. ISBN 0763700665.
- Hallam A & Wignall PB (1997) Mass extinctions and their aftermath. Oxford University Press. ISBN: 0-19-854916-4.
- Hallegraeff GM (1993) A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32: 79–99.
- Hallegraeff GM (2009) Impacts of climate change on harmful algal blooms. SciTopics, http://www.scitopics.com/Impacts_of_Climate_Change_on_Harmful_Algal_Blooms.html
- Hallegraeff GM (2010) Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *Journal of Phycology*, 46: 220-235.
- Held P & Raymond K (2011) Determination of Algal Cell Lipids Using Nile Red - Using Microplates to Monitor Neutral Lipids in *Chlorella Vulgaris*. *Biofuel Research*, 8:1-5.
- Hoagland P, Anderson DM, Kaoru Y & White AW (2002) The economic effects of harmful algal blooms in states: estimates, assessment issues, and information. *Estuaries*, 25, 819-837.
- Hoffmann AA & Sgrò CM (2011) Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470: 479-485.
- Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M., van der Linden PJ, Dai X, Maskell K & Johnson CA (2001). Climate change 2001: the scientific basis. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0521 80767 0.
- Howarth RW, Anderson D, Cloern J, Elfring C, Hopkinson C, Lapointe B, *et al.* (2000) Nutrient pollution of coastal rivers, bays, and seas. *Iss Ecol* 7: 1-15.

- Howells EJ, Beltran VH, Larsen NW, Bay LK, Willis BL & Van Oppen MJH (2011). Coral thermal tolerance shaped by local adaptation of photosymbionts. *Nature Climate Change*, 2: 116-120.
- Hrudey S, Burch S, Burch M, Drikas M & Gregory R (1999) Remedial measures. In: Chorus I & Bartram J (eds) Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. Routledge, London, UK, pp. 275-312.
- Huertas IE, Rouco M, López-Rodas V & Costas E (2010) Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytologist*, 188: 478-487.
- Huertas IE., Rouco M, López-Rodas V & Costas E (2011) Warming will affect phytoplankton differently: evidence through a mechanistic approach. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278: 3534-3543.
- Iannaccone LR & Touchette BW (2008) A shift in phytoplankton dominance from cyanobacteria to chlorophytes following algaecide applications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 619: 303–304.
- IPCC (2007) Synthesis Report. Directores de la publicación: Pachauri RK & Reisinger A. Ginebra, Suiza.
- IPCC (2013) Climate Change. The Physical Science Basic. Directores de la publicación: Stocker T, Dahe Q & Plattner GK. Ginebra, Suiza.
- Iwamoto T & Nasu M (2001) Current bioremediation practice and perspective. Review. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92: 1-8.
- Jacobsen S (2001) Gas hydrates and deglaciations. *Nature*, 421: 691.
- Jansen E, Overpeck J, Briffa KR, Duplessy JC, Joos F, Masson-Delmotte V, Olago D, Otto-Bliesner B, Peltier WR, Rahmstorf S *et al.* (2007) Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In Climate Change 2007: The Physical Science Basis; Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M & Miller HL, (Eds) Cambridge University Press: Cambridge, UK; New York, NY, USA, pp. 433-497.
- Jenkins GS & Smith SR (1999) GCM simulation or snowball Earth conditions during the late Proterozoic. *Geophysical Research Letters*, 26: 2263-2266.

- Jin P, Gao K & Beardall J (2013) Evolutionary responses of a coccolithophorid *Gephyrocapsa oceanica* to ocean acidification. *Evolution* (online in advance of print.doi:10.1111/evo.12112)
- Joint, I., S. C. Doney, and D. M. Karl. 2011. Will ocean acidification affect marine microbes? *ISME J.* 5:1–7.
- Jones AM, Berkelmans R, van Oppen MJ, Mieog JC & Sinclair W (2008) A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275: 1359-1365.
- Juwarkar A, Singh S & Mudhoo A (2010) A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 9: 215-288.
- Kathuria V (2006) Controlling water pollution in developing and transition countries lessons from three successful cases. *Journal of Environmental Management*. 78: 405–426.
- Keightley PD & Lynch M (2003) Toward a realistic model of mutations affecting fitness. *Evolution*, 57: 683-685.
- Kimura M & Maruyama T (1966) The mutational load with epistatic gene interactions in fitness. *Genetics*, 54: 1337-1351.
- Kimura M (1983) *The neutral Theory of Molecular Evolution* (Cambridge University Press. Cambridge.
- Kohler T, Michea-Hamzepour M, Plesiat P, Kahr AL & Pechere JC (1997) Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 2540–2543.
- Korona, R. (1996). Genetic divergence and fitness convergence under uniform selection in experimental populations of bacteria. *Genetics*, 143(2), 637-644.
- Kramer U, Talke IN & Hanikenne M (2007) Transition metal transport. *FEBS Letters* 581: 2263-2272.
- Kring DA (2007) The Chicxulub impact event and its environmental consequences at the Cretaceous–Tertiary boundary. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 255: 4–21
- Kutschera U & Niklas KJ (2004) The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Naturwissenschaften*, 91: 255–276.

- Kwiatkowski RE & Roff JC (1976) Effects of acidity on the phytoplankton and primary productivity of selected northern Ontario lakes. *Canadian Journal of Botany*, 54: 2546-2561.
- Lal R, Pandey G, Sharma P, Kumari K, Malhotra S, Pandey R, Raina V, Kohler HPE, Holliger C, Jackson C & Oakeshott JG (2010) Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74: 58–80.
- Lande R (2007) Expected relative fitness and the adaptive topography of fluctuating selection. *Evolution*, 61:1835–1846.
- Leakey R & Lewin L (2008) La sexta extinción. Tusquets Editores S.A., Barcelona. ISBN: 978-84-8310-551-1.
- Lederberg J & Lederberg EM (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, 63: 399-406.
- Lee CTA, Wasserburg GJ & Kyte FT (2003) Platinum-group elements (PGE) and rhenium in marine sediments across the Cretaceous–Tertiary boundary: constraints on Re-PGE transport in the marine environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67: 655-670.
- Le Jeune AH, Charpin M, Deluchat V, Briand JF, Lenain JF, Baudu M & Amblard C (2006) Effect of copper sulphate treatment on natural phytoplankton communities. *Aquatic Toxicology*, 80: 267-280.
- Lenski RE (1998) Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *International Microbiology*, 1: 265-270.
- Lenski RE, Rose MR, Simpson SC & Tadler SC (1991) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2,000 generations. *American Naturalist*, 1315-1341.
- Levin HL (2010) The earth through time. Ed. John Wiley & Sons. Inc. NJ. ISBN-10: 0-470-38774-2.
- Lindsey HA, Gallie J, Taylor S & Kerr B (2013) Evolutionary rescue from extinction is contingent on a lower rate of environmental change. *Nature*, 494: 463-467.
- Lilly EL, Kulis DM, Gentien P (2002) Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *Journal of Plankton Research*, 24: 443-452.

- Litchman E, Edwards KF, Klausmeier CA & Thomas MK (2012) Phytoplankton niches, traits and eco-evolutionary responses to global environmental change. *Marine Ecology Progress Series*, 470: 235-248.
- Lohbeck KT, Riebesell U & Reusch TB (2012) Adaptive evolution of a key phytoplankton species to ocean acidification. *Nature Geoscience*, 5: 346-351.
- López-Rodas V, Agrelo M, Carrillo E, Ferrero L, Larrauri A, Martín-Otero L & Costas E (2001) Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *European Journal of Phycology*, 36: 179-190.
- López-Rodas V, Costas E, Bañares-España E, García-Villada L, Altamirano M, Rico M, Salgado C & Flores-Moya A (2006) Analysis of polygenic traits of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) strains by Restricted Maximum Likelihood (REML) procedures: 2. Microcystin net production, photosynthesis and respiration. *Phycologia*, 45:243–248
- López-Rodas V, Flores-Moya A, Maneiro E, Perdígones N, Marvá F, García ME & Costas E (2007) Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of preselective mutations. *Evolutionary Ecology*, 21: 535-547.
- Lopez-Rodas V, Maneiro, E., Lanzarot, M. P., Perdígones, N. & Costas, E (2008a) Mass wildlife mortality due to cyanobacteria in the Donana National Park in Spain. *Veterinary Record*, 162, 317–323.
- López-Rodas V, Marvá F, Costas E & Flores-Moya A (2008b) Microalgal diversity in the stressful acidic, metal-rich mine waters from Mynydd Parys (N Wales, UK) could be due to selection of preselective mutants. *Environmental Experimental Botany*, 64: 43-48.
- López-Rodas V, Marvá F, Rouco M, Costas E & Flores-Moya A. (2008c) Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to the stressful acidic, mine metal-rich waters from Aguas Agrias Stream (SW Spain) as result of pre-selective mutations. *Chemosphere*, 72:703-707.
- López-Rodas V, Costas E & Flores-Moya A (2011) Genetic adaptation of phytoplankters to herbicides. In: Kortekamp, A., ed. *Herbicides and Environment*. Intech, Croatia, pp. 421-432.
- Lovejoy TE & Hannah L (2005) *Climate Change and Biodiversity*. Yale University Press, New Haven, CT. 418 pp.

- Luria S & Delbrück M (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28: 491–511.
- Lüthi D, Le Floch M, Bereiter B, Blunier T, Barnola JM, *et al.* (2008) High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000-800,000 years before present. *Nature*, 453: 379 – 382.
- Lynch M, Gabriel W & Wood A (1991) Adaptive and demographic responses of plankton populations to environmental change. *Limnol. Oceanogr.* 36: 1301–1312.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Fernández CR & Pérez MS (2004) Brock biología de los microorganismos (10ª Ed). Madrid: Prentice hall.
- Margalef R, Duran M & Saiz F (1955) El fitoplancton de la ría de Vigo de enero a marzo de 1954. *Investigación Pesquera*, 2: 85-129.
- Margalef R (1956) Estructura y dinámica de la “purga de mar” en la Ría de Vigo. *Investigación Pesquera*, 5: 113-134.
- Margalef R. 1992. Planeta azul, planeta verde. Prensa Científica SA. Barcelona. ISBN: 84-7593-046-8
- Martin J (1999) Cambios climáticos. Una aproximación al sistema Tierra. Ediciones Libertarias/Prodhuvi, Madrid. ISBN: 84-7954-542-9.
- Martín-Peinado FJ & Rodríguez-Tovar FJ (2010) Mobility of iridium in terrestrial environments: Implications for the interpretation of impact-related mass-extinctions *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74: 4531–4542.
- Marvá F, López-Rodas V, Rouco M, Navarro M, Toro FJ, Costas E & Flores-Moya A (2010) Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquatic Toxicology*, 26: 130-134.
- Mergey J & Santamaria L (2012), Evolution and Biodiversity: the evolutionary basis of biodiversity and its potential for adaptation to global change. *Evolutionary Applications*, 5: 103–106.
- Mieog JC, Olsen JL, Berkelmans R, Bleuler-Martinez SA, Willis BL & van Oppen MJH (2009) The roles and interactions of symbiont, host and environment in defining coral fitness. *PLoS One* 4: e6364.
- Moore GT & Kellerman KF (1904) A method of destroying or preventing the growth of algae and certain pathogenic bacteria in water supplies. *United States Department of Agriculture Bureau of Plant Industry Bulletin*, 64: 15-44.

- Mousseau TA & Roff DA (1987) Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity*, 59: 181-197.
- Mur LR, Skulberg OM & Utkilen H (1999) Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I & Bartram J (Eds). Toxic cyanobacteria in water: a guide to the public health consequences, monitoring and management. London: Spon. 14- 40.
- Muscattine L & Porter JW (1977) Reef corals mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bioscience*, 27, 454–460.
- Myers N & Knoll AH (2001) The biotic crisis and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98: 5389–5392.
- Newcombe HB (1949) Origin of Bacterial Variants. *Nature*, 164: 150-151.
- Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, *et al.*, (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science*, 15: 684–692
- Nielsen HD & Nielsen SL (2005) Photosynthetic responses to Cu²⁺ exposure are independent of light acclimation and uncoupled from growth inhibition in *Fucus serratus* (Phaeophyceae). *Marine Pollution Bulletin*, 51: 715-721.
- Novick A & Szilard L (1950) Experiments with the chemostat on spontaneous mutations in bacteria. *Proceedings of the National Academic of Science of the USA*, 36: 708.
- Occhipinti-Ambrogi A & Savini D (2003). Biological invasions as a component of global change in stressed marine ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 542-551.
- Ojaveer H, Kotta J, Pollum A, Pollup M, Jaanus A & Vetemaa M (2011) Alien species in a brackish water temperate ecosystem: Annual-scale dynamics in response to environmental variability. *Environmental Research*, 111: 933–942.
- Orellana G, López-Rodas V, Costas E, Maneiro E & Haigh D (2008) Biosensores basados en microalgas para la detección de contaminantes medioambientales. CT/ES2008/000465, 2008, P200701905.
- Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney SC, Feely RA, Gnanadesikan A, *et al.* (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437: 681 – 686.
- Ortiz JA, Rueda A, Carbonell G, Camargo JA, Nieto F, Reoyo MJ & Tarazona JV (1993) Acute toxicity of sulfide and lower ph in cultured rainbow trout, Atlantic

- salmon, and coho salmon. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 50: 164-170.
- Palumbi SR (2001) Evolution-Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*, 293: 1786-1790.
- Pennington JT, Mahoney KL, Kuwahara VS, Kolber DD, Calienes R & Chavez FP (2006) Primary production in the eastern tropical Pacific: a review. *Progress in Oceanography*, 69: 285–317.
- Penny D & Poole A (1999) The nature of the last universal common ancestor. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9: 672–77.
- Peña-Haro S, Llopis-Albert C, Pulido-Velazquez M & Pulido-Velazquez (2010) D Fertilizer standards for controlling groundwater nitrate pollution from agriculture: El Salobral-Los Llanos case study, Spain. *Journal of Hydrology*, 392: 174-187.
- Pérez-Zaballos FJ, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Navarro-Lozano V, García-Villada L & Costas E (2005) Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. *Journal of Parasitology*, 91: 507–510.
- Pimentel D (1971) Ecological effects of pesticides on nontarget species. Executive Office of the President's Office of Science and Technology. Washington, DC: USA.
- Plumley FG (1997) Marine algal toxins: biochemistry, genetics, and molecular biology. *Limnology and Oceanography*, 1252-1264.
- Rabalais NN, Turner RE, Dortch Q, Justic D, Bierman VJ & Wiseman WJ (2002) Nutrient-enhanced productivity in the northern Gulf of Mexico: past, present and future. *Hydrobiologia*, 475: 39–63.
- Raven JA, Caldeira K, Elderfielf H, Hoegh-Guldberg O, Liss P *et al.* (2005) Ocean Acidification due to Increasing Atmospheric Carbon Dioxide. Royal Society, London. ISBN 0 85403 617 2.
- Rawat M, Ramanathan AL & Subramanian V (2009) Quantification and distribution of heavy metals from small-scale industrial areas of Kanpur city, India. *Journal of Hazardous Materials*, 172: 1145–1149.
- Reboud X, Majerus N, Gasquez J & Powles S (2007) *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system for pro-active herbicide resistance evolution research. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91: 257-266.

- Reguera B, Alonso R, Moreira A & Méndez S (2011) Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas. COI de UNESCO y OIEA, Paris y Viena 2011. Manuales y Guías de la COI, 59.
- Renne PR, Deino AL, Hilgen FJ, Kuiper KF, Mark DF, Mitchell WS, Morgan LE, Mundil R & Smit Jan (2013) Time Scales of Critical Events Around the Cretaceous-Paleogene Boundary. *Science*, 339: 684-687.
- Reuman DC, Holt, RD & Yvon-Durocher, G (2014) A metabolic perspective on competition and body size reductions with warming. *Journal of Animal Ecology*, 83: 59-69.
- Reusch TB & Boyd PW (2013). Experimental evolution meets marine phytoplankton. *Evolution Special Section*, 1-12.
- Rigas F, Papadopoulou K, Dritsa V & Doulia D (2007) Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*, 140: 325–332.
- Rodríguez G, Villasante S & Carme García-Negro MD (2011) Are red tides affecting economically the commercialization of the Galician (NW Spain) mussel farming? *Marine Policy*, 35: 252-257.
- Rosenberg SM (2001) Evolving responsively: adaptive mutation. *Nature Reviews Genetics*, 2: 504-515.
- Rossi S (2011) El planeta azul: Un universo en extinción. Ute Körner Literary Agent S.L. ISBN: 978-84-8306-921-9
- Rost B, Zondervan I & Wolf-Gladrow D (2008) Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: current knowledge, contradictions and research directions. *Marine Ecology Progress Series*, 373: 227-237.
- Rouco M, López-Rodas V, Flores-Moya A & Costas E (2011) Evolutionary changes in growth rate and toxin production in the cyanobacterium *Microscytis aeruginosa* under a scenario of eutrophication and temperature increase. *Microbial Ecology*, 62, 265-273.
- Sabine CL, Feely RA, Gruber N, Key RM, Lee K, *et al.* (2004) The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science*, 305:367–371.
- Sabine CL & Feely RA (2007) The oceanic sink for carbon dioxide. In *Greenhouse Gas Sinks* D Reay, N Hewitt, J Grace & K Smith (eds) pp. 31–49.
- Sánchez-Fortún S, Marvá F, Rouco M, López-Rodas V, & Costas E (2009a) Toxic effect and adaptation in *Scenedesmus intermedius* to anthropogenic

- chloramphenicol contamination: genetic versus physiological mechanisms to rapid acquisition of xenobiotic resistance, *Ecotoxicology*, 18:481–487.
- Sánchez-Fortún S, López-Rodas V, Navarro M, Marvá F, D'ors A, Rouco M, Haigh-Florez D & Costas E (2009b) Toxicity and adaptation of *Dyctiosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 1901-1905.
- Santos SR, Gutierrez-Rodriguez C, Lasker HR & Coffroth MA (2003) Symbiodinium sp. associations in the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* in the Bahamas: high levels of genetic variability and population structure in symbiotic dinoflagellates. *Marine Biology* 143: 111-120.
- Shahidul I & Tanaka M (2004) Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 624–649.
- Silver S (1996) Bacterial resistance to toxic metal ions-a review. *Gene*, 179: 9-19.
- Simon N, Cras AL, Foulon E & Lemée R (2009) Diversity and evolution of marine phytoplankton. *C. R. Biologies*, 332: 159–170.
- Slaughter RA (2012). Welcome to the anthropocene. *Futures*, 44: 119-126.
- Sleep N (2001) Oxygenating the atmosphere. *Nature*, 410: 317-319.
- Slifkin M & Doyle RJ (1990) Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 3: 197–218.
- Smith VH (2003) Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. *Environmental Science and Pollution Research*, 10: 126–139.
- Smolyakov BS, Ryzhikh AP & Romanov RE (2010) The fate of Cu, Zn, and Cd in the initial stage of water system contamination: The effect of phytoplankton activity. *Journal of Hazardous Materials*, 184: 819–825.
- Sniegowski PD (2005) Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. *New Phytologist*, 166: 360–362.
- Sniegowski PD & Lenski RE (1995) Mutation and adaptation: the directed mutation controversy in evolutionary perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26: 553- 578.
- Soldo D & Behra R (2000) Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology*, 47: 181–189.

- Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, *et al.* (2007) Climate Change 2007: The Physical Science Basis: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. New York: Cambridge Univ. Press
- Spiess EB (1989) Genes in Populations. Wiley, New York, NY, USA.
- Stokes PM, Hutchinson TC & Krauter K (1973) Heavy metal tolerance in algae isolated from contaminated lakes near Sudbury, Ontario. *Canadian Journal of Botany*, 51: 2155–2168.
- Sweatman H, Delean S & Syms C (2011) Assessing loss of coral cover on Australia's Great Barrier Reef over two decades, with implications for longer-term trends. *Coral Reefs*, 30: 521-531.
- Takahashi S, Yoshioka-Nishimura M, Nanba D & Badger MR (2013) Thermal Acclimation of the Symbiotic Alga *Symbiodinium* spp. Alleviates Photobleaching under Heat Stress. *Plant physiology*, 161: 477-485.
- Takamura, N, Kasai F & Watanabe MM (1989) Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *Journal of Applied Phycology*, 1: 39-52.
- Takamura N, Kasai F & Watanabe MM (1990) Unique response of Cyanophyceae to copper. *Journal of Applied Phycology*, 2: 293-296.
- Thomas MK, Kremer CT, Klausmeier CA & Litchman E (2012) A Global Pattern of Thermal Adaptation in Marine Phytoplankton. *Science*, 338: 1085-1088.
- Thrusfield M (1995) Veterinary Epidemiology. Blackwell Science, New York. ISBN: 0-632-04036-X.
- Torres MA, Barros MP, Campos SCG, Pinto E, Rajamani S, Sayre RT & Colepicolo P (2008) Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 1– 15.
- Travisano M, Mongold JA, Bennet FA & Lenski RE (1995) Experimental tests of the roles of adaptation, chance and history in evolution. *Science*, 267, 87-90.
- Urban MC, De Meester L, Vellend M, Stoks R, Vanoverbeke J (2012) A crucial step toward realism: responses to climate change from an evolving metacommunity perspective. *Evolutionary Applications*, 5: 154–167.
- Uriarte A (2003) Historia del clima de la tierra. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. San Sebastián, 1-01010 Vitoria Gasteiz. ISBN: 84-457-2079-1.

- van Doesburg W, van Eekert MH, Middeldorp PJ, Balk M, Schraa G & Stams AJ (2005) Reductive dechlorination of beta-hexachlorocyclohexane (beta-HCH) by a *Dehalobacter* species in coculture with a *Sedimentibacter* sp. *FEMS Microbiology Ecology*, 54: 87–95.
- van Oppen MJ, Souter P, Howells EJ, Heyward A & Berkelmans R (2011) Novel genetic diversity through somatic mutations: fuel for adaptation of reef corals? *Diversity*, 3: 405-423.
- Varona-Cordero F & Mendieta FJG (2003) Estudio multivariado de la fluctuación espacio-temporal de la comunidad fitoplanctónica en dos lagunas costeras del estado de Chiapas. *Hidrobiológica*, 13: 177-194.
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, *et al.* (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*, 7: 737–750.
- Wagenaar DA & Adami C (2004) Influence of chance, history and adaptation on digital evolution. *Artificial Life*, 10, 181-190.
- Ward PD, Haggart JW, Carter ES, Wilbur D, Tipper HW & Evans T (2001) Sudden productivity collapse associated with the Triassic–Jurassic boundary mass extinction. *Science*, 292: 1148 – 1151.
- Weber K (2004) Population size and long-term selection. *Plant Breeding Reviews*, 24:249–268.
- Weber R, Watson A, Forter M & Oliaei F (2011) Persistent organic pollutants and landfills: a review of past experiences and future challenges. *Waste management & research*, 29: 107-121.
- Wetzel RG (2001) Limnology Lake and River Ecosystems. 3rd edition. Academic Press SanDiego. ISBN: 798-0-12-744760-5.
- Whipple SJ, Patten BC & Peter G (2005) Verity Life cycle of the marine alga *Phaeocystis*: A conceptual model to summarize literature and guide research. *Journal of Marine Systems*, 57: 83 – 110.
- Whitlock MC, Phillips PC, Moore FBG & Tonsor SJ (1995) Multiple fitness peaks and epistasis. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26, 601-629.
- Wilkinson C (2008) Status of the coral reefs of the world: 2008 Global Coral Reef Monitoring Network and Reef and Rainforest Research Centre. AIMS (Australian Institute of Marine Science), Townsville, Australia.

- Williams C (1996) Combating marine pollution from land-based activities: Australian initiatives. *Ocean and Coastal Management*, 33: 87–112.
- Williams DM, Kasting JF & Frakes LA (1998) Low latitude glaciation and rapid changes in the earth's obliquity explained by obliquity-oblateness feedback. *Nature*, 396:453-455.
- Winder M & Sommer U (2012) Phytoplankton response to a changing climate. *Hydrobiologia*, 698: 5-16.
- Woodruff DS (2001) Declines of biomes and biotas and the future of evolution *Proceeding of the Natural Academy of Sciences of the USA*, 98: 5471-5476.
- Wright S (1932) The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. *Proceedings of the 6th International Congress of Genetics*, 1, 356-366.
- Wright S (1988) Surfaces of selective value revisited. *The American Naturalist*, 131: 115–123.
- Wolfe AP, Hobbs WO, Birks HH, Briner JP, Holmgren SU, Ingólfsson O, Kaushal SS, Miller GH, Pagani M, Saros JE & Vinebrooke RD (2013) Stratigraphic expressions of the Holocene–Anthropocene transition revealed in sediments from remote lakes. *Earth-Science Reviews*, 116, 17-34.
- Wu ZX, Gan NQ, Huang Q & Song LR (2007) Response of *Microcystis* to copper stress—Do phenotypes of *Microcystis* make a difference in stress tolerance? *Environmental Pollution*, 147: 324-330.
- Zhang H, Hu C, Jia X, Xu Y, Wu C, Chen L & Wang F (2012). Characteristics of γ -hexachlorocyclohexane biodegradation by a nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena azotica*. *Journal of Applied Phycology*, 24: 221-225.
- Zhao D (2007) Seismic images under 60 hotspots: Search for mantle plumes. *Gondwana Research*, 12: 335–355.